БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 9, с. 1189 – 1212

УДК 57 (091)

ИСТОРИЯ РАННИХ ИССЛЕДОВАНИЙ БАКТЕРИОФАГОВ И РОЖДЕНИЕ ОСНОВНЫХ КОНЦЕПЦИЙ ВИРУСОЛОГИИ

Обзор

© 2020 А.В. Летаров[1,2]

[1] *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН, 117312 Москва, Россия; электронная почта: letarov@gmail.com*

[2] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 06.07.2020
После доработки 02.08.2020
Принята к публикации 02.08.2020

Вирусы бактерий – бактериофаги – были открыты спустя более 20 лет после открытия вирусов растений и животных, однако именно исследования бактериофагов в течение первых 40 лет их изучения привели к созданию современной концепции вируса и в большой мере легли в основание зарождающихся молекулярной генетики и молекулярной биологии. Отдельные аспекты истории ранних исследований бактериофагов хорошо описаны в специальных работах. В этом обзоре дается общая картина ключевых событий, приведших к созданию основных концепций вирусологии. В частности, рассмотрены противостояние идей Ф. д'Эрелля и Ж. Бордэ по вопросу о природе бактериофага, история открытия явления лизогении и установления природы, работы фаговой группы, созданной М. Дельбрюком в США, создание методологии генетического анализа бактериофагов и другие исследования, приведшие к пониманию вируса (бактериофага) как трансмиссивной генетической программы. Также рассмотрена история первых попыток практического применения бактериофагов, таких, как фаговая терапия и фаготипирование.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериофаги, история исследований, открытие бактериофагов, Фаговая группа, открытие лизогении, история фаговой терапии.

DOI: 10.31857/S0320972520090031

Для многих молодых ученых будущее гораздо важнее прошлого, и история науки начинается завтра.
<однако>
Не стоит недооценивать опасность парашютирования молодых энтузиастов науки прямо на цветущую поляну тщательно отобранных данных и полностью распустившихся концепций.

Андре Львов, 1953 г.

ВВЕДЕНИЕ

Биология бактериофагов занимает особое место в истории биологической науки 20 столетия. Начавшись чуть более столетия назад, исследования в этой области привели к созданию первой достаточно универсальной и безопасной технологии этиотропной терапии бактериальных инфекций, первой технологии высокоразрешающего типирования штаммов бактерий, позволили раскрыть природу вирусной инфекции как явления и в значительной мере стали основанием для раскрытия молекулярных механизмов наследственности. Различные аспекты «романтического» периода первых десятилетий исследований фагов, когда был осуществлен прорыв к совершенно новой концептуальной базе биологической науки, достаточно подробно исследованы и стали темой многочисленных обзоров, в том числе процитированных в этой статье. Особое место среди них занимает вводная глава Stent [1] к сборнику подобранных

Принятые сокращения: ФТ – фаговая терапия.

им ключевых публикаций по биологии бактериофагов, вышедшему в 1960 г., в которой он дает подробный обзор истории развития данной области. В этих работах были предприняты интересные попытки реконструкции процесса, формирования концепции вируса как трансмиссивной генетической программы, причины успехов и неудач различных фаговых технологий, наиболее известной из которых является фаговая терапия. К сожалению, однако, действующие исследователи и преподаватели биологических дисциплин зачастую не имеют возможности посвятить много времени изучению частных аспектов истории биологии бактериофагов. Кроме того, работа с существующим историографическим материалом требует весьма специальной подготовки (особенно это относится к процитированной работе Stent [1]), что осложняет восприятие написанного более широким кругом читателей, не занимающихся профессионально биологией бактериофагов.

Принципиальное значение здесь имеет также тот факт, что методологическая парадигма современной микробиологии драматически отличается от методов науки 1920–1950-х гг. Если в современной науке стандартом качества является получение прямых доказательств и непосредственной визуализации изучаемых явлений и объектов, то в науке того периода обычным было основывать выводы на многоступенчатых косвенных построениях, которые не были бы восприняты рецензентами современных журналов как достаточно убедительные. Тем не менее именно такие подходы, требовавшие большого объема лабораторной работы и огромных интеллектуальных усилий при планировании исследований и анализе полученных данных, в итоге привели к созданию важнейших концепций биологии – концепции вируса как трансмиссивной генетической программы, а также основных постулатов молекулярной биологии.

Все это побудило автора постараться создать интегрирующее описание истории первых 40 лет развития биологии вирусов бактерий в относительно компактной форме, фокусируя свое внимание не столько на формальной историографии, сколько на воссоздании хода творческого процесса у ключевых исследователей и научных групп того времени. Первая попытка решить эту задачу была предпринята автором в соответствующей главе недавно вышедшей книги «Современные концепции биологии бактериофагов» [2]. В настоящей работе автор постарался дать более точное описание отдельных проблем, событий и персоналий в рамках очерченной области, одновременно приведя обзор существующих исторических работ.

СОСТОЯНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ НАУКИ НАКАНУНЕ ОТКРЫТИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

Первые сообщения об открытии талантливым голландским оптиком-самоучкой и исследователем микроскопистом Антони ван Левенгуком целого мира мельчайших живых существ, позднее названных микроорганизмами, датируются 1674 г. Это были одни из первых писем Левенгука Королевскому обществу в Лондоне [3]. Тем не менее микробиология, как самостоятельная отрасль биологической науки, обладающая своей методологией и теоретическими концепциями, была создана лишь во второй половине XIX века, в первую очередь благодаря пионерским работам Луи Пастера. Этот ученый заложил основы большинства главных направлений науки о микробах: физиологии и биохимии микроорганизмов, технической микробиологии, медицинской микробиологии и вакцинологии [3, 4]. Окончательный же триумф бактериологических методов в медицине и в ряде иных дисциплин стал возможен в результате деятельности немецкого микробиолога Роберта Коха, создавшего вместе со своими сотрудниками основы современной методологии работы с бактериальными культурами, которые остаются актуальными и поныне [3, 5]. Микробиологи школ Коха и Пастера, а также их последователи по всему миру в течение короткого времени (1876–1912 гг.) выделили и описали более 25 возбудителей различных бактериальных инфекций [3, 6]. В это же время благодаря работам Пастера и его школы, а также ряда первых иммунологов, стали доступны вакцины против целого ряда опасных заболеваний. Появились также первые лечебные токсин-нейтрализующие сыворотки, в том числе дифтерийная [7, 8] и чумная [9]. В клиническую практику вошла бактериологическая диагностика. Создаются специальные лаборатории для производства лечебных сывороток и вакцин, которые требовали наработки большого количества биомассы бактерий, например для получения соответствующих токсинов в количестве, достаточном для иммунизации животных. В частности, в России производство вакцин и сывороток было налажено при Императорском Институте экспериментальной медицины (ИИЭМ), а с 1900 г. все работы по особо опасным инфекциям проводились в лаборатории «Чумного форта» (один из старых морских фортов Кронштадта, который утратил военное значение и был реконструирован под «Особую лабораторию ИИЭМ по заготовлению противочумных препаратов на форте Александр I») [10].

Несмотря на высокий технический уровень науки о микробах и добытые обширные знания о разнообразии микроорганизмов, понимание того, что за сущность представляет из себя микроб, в это время лишь выкристаллизовывалось. Так, в микробиологии конца XIX – начала XX веков воспринимали в качестве организмов не столько клетки, сколько лабораторные культуры бактерий. Изменения в сознании исследователей, поставившие отдельную клетку в центр концепции микроорганизма, стали происходить лишь в 1920-е гг. Несмотря на то что идеи использования бактерий, как модельных объектов генетики, уже высказывались некоторыми учеными [11, 12], большинство микробиологов той эпохи понимало под наследственным аппаратом бактерий скорее выражение биохимического гомеостаза, отрицая возможность присутствия у них генов, аналогичных генам высших организмов [12].

Первые вирусы растений и животных были также открыты в конце XIX века. Это были вирус табачной мозаики, описанный в 1892 г. Ivanovski [13] и вирус ящура, открытый в 1898 г. Loeffler и Frosch [14]. Эти авторы продемонстрировали, что патогенные агенты, вызывающие данные заболевания, способны проникать сквозь фарфоровые бактериальные фильтры. Поэтому Д.И. Ивановским был предложен термин «фильтрующийся вирус», который использовался в литературе в течение длительного времени. Для становления первоначальных представлений о вирусах, качественно отличавших их от бактерий, существенную роль имели также работы М. Бейеринка (см. обзор van Kammen [11]), который установил способность вируса табачной мозаики диффундировать в агар. Это позволило ему сформулировать концепцию *contagium vivum fluidum* – жидкого инфекционного агента, в противоположность бактериальным патогенам, которые он определил как *contagium vivum fixum*. Бейеринк считал, что этот агент для размножения должен попасть в живую клетку.

В докторской диссертации Ивановского также описаны опыты по диффузии возбудителя табачной мозаики в агар с использованием в качестве контрольного объекта частичек туши, что позволило ему настаивать на предположении о корпускулярной природе инфекционного агента (Докторская диссертация Д.И. Ивановского «Мозаичная болезнь табака», [15, 16]). В ходе научной дискуссии между Ивановским и Бейеринком ([16] и ссылки в этой работе) М. Бейеринк признал приоритет Ивановского в открытии фильтрующегося инфекционного агента. Таким образом, Д.И. Ивановский был, очевидно, первым автором, описавшим вирус и сделавшим обоснованное предположение о его корпускулярной природе. М. Бейеринку, вероятно, принадлежит приоритет формулировки гипотезы о том, что для размножения вируса необходима живая клетка хозяина (в данном случае – растения).

Еще несколько возбудителей вирусных заболеваний людей, животных и растений были открыты в последующее десятилетие. Тем не менее физическая природа *contagium vivum fluidum* оставалась полностью неизвестной. Под словом «вирус» подразумевали не обязательно агент корпускулярной природы. Это могло быть, по мнению ученых того времени, и растворимое вещество, обладавшее одновременно патогенным действием и способностью стимулировать собственную продукцию в клетках зараженного организма, таким образом размножаясь (см. ниже). В силу этих причин восприятие концепции ультрамикроскопического неклеточного организма, которая как теперь кажется, была наиболее логичной интерпретацией имевшихся на том этапе экспериментальных результатов, происходило с большим трудом.

Без сомнения, в процессе микробиологической работы в лабораториях того времени неоднократно сталкивались и с действием бактериофагов. Как мы теперь знаем, эти вирусы практически вездесущи и часто являются причиной затруднений в выращивании жидких культур даже в современной лабораторной практике [17]. Спонтанный лизис бактериальных культур, безусловно, часто наблюдался микробиологами того времени, что интерпретировалось как явление автолиза (который действительно может иметь место и без всякого участия вирусов). Литература того времени, посвященная автолизу, достаточно обширна, но ни один из авторов не высказывал предположения об инфекционном агенте, поражающем бактерии. В своем обзоре Abedon et al. [18] приводят 30 ссылок на научные статьи, вышедшие до 1917 г., которые могли бы считаться кандидатами в «предысторические» описания активности бактериофагов.

Наиболее ранняя из этих работ, которая часто упоминается в качестве предтечи первых описаний бактериофагов – это статья британского химика и микробиолога Эрнста Ханбери Ганкина (Ernest Hanbury Hankin; 1865–1939), который в 1898 г. сообщил о литическом действии профильтрованной через бактериальные фильтры воды индийских рек Ганг и Джумна по отношению к культурам возбудителя холеры [19]. Поскольку это действие уничтожалось прогреванием воды, Hankin сделал вывод, что оно вызвано летучим бактерицидным вещест-

вом. Впоследствии это заключение воспринималось большинством историков как досадная ошибка, сделанная от недостатка проницательности и не позволившая Ганкину развить свои исследования и первым описать вирусы, поражающие бактерий. Однако тщательное изучение работы Hankin позволило Abedon et al. [18] предположить, что описанное им явление, скорее всего, действительно не относится к бактериофагии. В работе Hankin имеются указания на то, что прогревание воды в плотно закрытых пробирках не вызывало инактивации литического начала. Кроме того, скорость гибели культур холерного вибриона под действием воды была настолько высока, что для этого потребовалась концентрация специфического холерного фага порядка 10^6–10^7 частиц в 1 мл, что для речной воды маловероятно.

Один из основателей отечественной микробиологии Николай Федорович Гамалея (1859–1949) описывал автолиз культур *Baclillus anthracis* [20, 21]. Гамалея выделил из лизата некое вещество путем его осаждения уксусной кислотой и перерастворения в аммиаке (к сожалению, детали этой процедуры в его работе отсутствуют). Это вещество было, как считал Гамалея, литическим ферментом. Действие данного фермента было достаточно специфичным – он хорошо лизировал клетки *B. anthracis* и не действовал или действовал очень слабо на другие микроорганизмы. Наиболее интересным было то, что действие «литического фермента» было трансмиссивным, т.е. из лизированной этим препаратом культуры можно было приготовить новую порцию агента, обладавшего такой же активностью и т.д. Несмотря на неполноту описания экспериментов (что было вполне в традиции научных публикаций того времени) можно заключить, что с высокой долей вероятности Н.Ф. Гамалея действительно имел дело с бактериофагом *B. anthracis*, но в своей интерпретации полученных данных ограничился только чисто биохимическим механизмом, не высказав никаких предположений о возможном действии живого инфекционного агента.

Таким образом, приходится признать, что воздействие бактериофагов, которое неизбежно должно было наблюдаться ранними микробиологами достаточно часто, практически не нашло отражения в научной литературе того времени. По-видимому, фаговый лизис культур обычно воспринимался как методическое нарушение, которое заставляло экспериментаторов просто повторять неудачные опыты более тщательно вместо того, чтобы искать причину произошедшего эффекта.

ОТКРЫТИЕ ВИРУСОВ БАКТЕРИЙ

Первое бесспорное описание вирусной инфекции у бактерий принадлежит Фредерику Уильяму Туорту (Frederik William Twort; 1877–1950). Этот ученый, работавший в Брауновском ветеринарном институте в Лондоне, ставил эксперименты, имевшие своей целью выращивание на бесклеточных питательных средах разнообразных фильтрующихся вирусов, в том числе вируса осповакцины. Ранее Туорт достиг значительного успеха, научившись культивировать возбудителя проказы, а затем возбудителя болезни Джонса (воспалительное заболевание кишечника жвачных животных, вызываемое *Mycobacterium avium* подвид *paratuberculosis*), добавляя к средам экстракт бактерий *M. tuberculosis,* культивирование которых было налажено еще Робертом Кохом. Впоследствии было выяснено, что фактором роста, который содержался в биомассе возбудителя туберкулеза, был витамин K [22]. Будучи вдохновлен этим успехом, Туорт предположил, что вирусы могут быть сродни паразитическим бактериям, которые приобрели крайне сложные питательные потребности. Он рассчитывал, что в отличие от паразитических вирусов, существуют и свободноживущие их формы, которые могут быть проще в культивировании. Параллельно с попытками выделения таких свободноживущих вирусов из разного природного материала Туорт попробовал также вырастить вирус осповакцины из препарата вакцины, которую в те времена получали культивированием вируса коровьей оспы на коже животных, вследствие чего препараты часто бывали контаминированы различными бактериями.

На чашках с посевами осповакцины Туорт обнаружил колонии «желтых и белых микрококков» (вероятнее всего *Staphylococcus*), которые, очевидно, были контаминацией. Однако он обратил внимание на то, что часть колоний были полупрозрачными и имели консистенцию, отличную от нормальных колоний. Туорт установил, что в стекловидных колониях живых клеток стрептококков почти нет, а вместо них имеются мелкие частицы, по-видимому, обломки клеток, не дающие роста при пересеве. В то же время материал из стекловидных колоний, перенесенный на свежие колонии, вызывал их «стекловидную трансформацию» (необходимо отметить, что это довольно редкое явление для бактериофагов – обычно действие этих вирусов невозможно заметить на уже выросших колониях, для этого требуется произвести заражение в начале их развития; это дало в дальнейшем д'Эреллю основание сомневаться в том, что феномен Туорта идентичен описанной им бактери-

офагии), но наибольшей активностью агент Туорта обладал против молодых активно растущих культур. Для фильтрации материала Туорт предварительно разбавлял его водой в 1 миллион раз. Нанося такой фильтрат на засеянные микрококками пробирки со скошенным агаром, он наблюдал образование на штрихе бактерий прозрачных пятен, количество которых зависело от степени разведения материала. Все эти результаты были опубликованы в статье, вышедшей в журнале *Lancet* в 1915 г. [23]. В этой работе Туорт высказал осторожное предположение, что изученное им явление – результат действия вируса, поражающего бактерии, однако посчитал, что окончательно разрешить вопрос не представляется возможным, поскольку о природе вирусов ничего не известно. Обсуждая возможные гипотезы, Туорт высказывает мнение, что его агент может быть ультрамикроскопическим организмом, сродни бактерии или амёбе (!), однако тут же замечает: «... необходимо помнить, что если мир живого был медленно построен в соответствии с теориями эволюции, то амёба и бактерия должны быть признаны высокоразвитыми организмами в сравнении с намного более примитивными формами, которые существовали и, возможно, продолжают существовать в наши дни. Вполне возможно, что ультрамикроскопический вирус лежит где-то в огромном поле жизни, более низко организованной, чем бактерия и амёба. Это может быть живая протоплазма, не образующая определенных индивидуумов или фермент, обладающий способностью к росту».

Более того, в своей короткой статье Туорт описывает вторичный рост бактериальной культуры после фагового лизиса (видимо, за счет образования устойчивых мутантов), а также явление стабильно перевиваемой ассоциации бактериальной культуры и вируса, которая, несмотря на множественные пассажи обладает способностью формировать пятна «стекловидной трансформации» (т.е. фаговые бляшки). Это «спонтанное проявление разрушительного начала» представляется Туорту интересным с позиции объяснения природы рака.

Таким образом, в одной короткой статье талантливого британского микробиолога имеется не только сообщение об открытии фильтруюшегося вируса бактерий, но и довольно успешная попытка найти ему место в общебиологической картине мира, предвосхитившая одну из современных теорий возникновения вирусов, считающую их реликтами доклеточного этапа биогенеза [24].

К сожалению, Ф. Туорт не имел возможности продолжить исследования обнаруженного им феномена из-за сложностей военного времени и финансовых затруднений. Он был вынужден поступить на военную службу. Капитан Туорт служил в военно-медицинской лаборатории в Салониках до 1917 г., однако его отношения с военным начальством не сложились, поэтому он не стал продлевать контракт и вернулся в Англию. Тем не менее после войны Туорт не пожелал присоединиться к исследованию открытых им вирусов бактерий, однако продолжил изыскания в попытках найти способ культивировать вирусы на бесклеточных средах [25], очевидно, не имевшие успеха. В результате работа Туорта 1915 г., которая по своему содержанию вполне могла бы претендовать на роль отправной точки развития современной вирусологии, не была замечена научной общественностью, и его формальный приоритет в открытии бактериофагов был установлен лишь позднее.

Честь «окончательного» открытия вирусов бактерий, равно как и авторство термина «бактериофаг», или сокращенно «фаг», принадлежит канадско-французскому ученому Феликсу д'Эреллю (Félix d'Herelle; 1873–1949). Бурная биография Феликса д'Эрелля, который, не имея высшего образования, оставил весьма яркий след в биологической науке, сама по себе представляет существенный интерес. К сожалению, за неимением места мы не можем пересказать ее здесь и адресуем читателя к мемуарам д'Эрелля, недавно опубликованным Dublanchet [26], а также к работе Summers [27]. Достаточно точное краткое описание его биографии можно также найти в соответствующей статье Википедии.

В 1911–1913 гг. д'Эрелль совершил два путешествия в Аргентину, в ходе которых создал и опробовал биологический метод борьбы с саранчой с помощью микроорганизма, выделенного им из этих насекомых. Именно в процессе работы над болезнями саранчи д'Эрелль впервые встречается с феноменом бактериофагии. В своих мемуарах он пишет, что кишечник инфицированных насекомых содержал почти чистую культуру патогенной бактерии (которую он называет коккобациллой). Чтобы получить отдельные колонии, исследователь использовал истощающий посев шпателем. В процессе этой работы он встретился с неожиданным явлением, которое в своих мемуарах [26] он описывает следующим образом: «...Но дважды в течение кампании возник неожиданный феномен, который привлек мое внимание. На первой чашке, той, на которой микробы были настолько многочисленны, чтобы образовать сплошной пастообразный слой, возникали чистые пятна, где культура, казалось, была удалена пробоотборником (à l'emporte-pièce). Среди них были малень-

кие пятна округлой формы и более крупные, неправильной формы, которые казались результатом слияния нескольких близко расположенных пятен. Как можно было объяснить это необычное явление, которое я раньше никогда не наблюдал на бактериальных культурах? Мое воображение заработало, и я в конечном итоге подумал, что, возможно, истинный патоген саранчи – это не коккобацилла, а другой микроб, очень маленький, невидимый вирус, ассоциированный с коккобациллой. ... Мы увидим, что именно этот феномен, на первый взгляд такой простой, положил начало исследованиям, которым предстояло посвятить тридцать лет работы и которые станут занятием для целых поколений бактериологов будущего».

Вернувшись в 1913 г. в Париж, д'Эрелль продолжил работать в Институте Пастера. В 1915 г. он исследовал вспышку дизентерии в драгунском эскадроне, расквартированном на отдых в городке Мезон-Лафит (Maisons-Laffitte) под Парижем. Будучи увлечен гипотезой, что диарея вызывается совместным действием неизвестного вируса и бактерии, д'Эрелль ставил эксперименты, аналогичные тем, которые он проводил во время работы по борьбе с саранчей. Он добавлял фильтрат фекалий пациентов к культуре дизентерийного микроба. В результате этих опытов часть культур, к которым добавляли фильтрат фекалий от *выздоравливавших* пациентов, лизировалась, а при посеве фильтратов, смешанных со свежей культурой дизентерийной палочки, на чашки с питательным агаром образовывались уже знакомые исследователю чистые округлые пятна (*tâches vièrges)*. Как д'Эрелль вспоминал впоследствии, он практически сразу понял, что имеет дело с вирусом, поражающим бактерии, который он (после обсуждения со своей женой и детьми) решил назвать бактериофагом (от греч. *фагос* – пожирающий). Сохранилась даже дата семейного совещания, на котором новый феномен получил название, существующее до наших дней – 18 октября 1915 г. [26].

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИРОДЫ БАКТЕРИОФАГА В 1920–1930 ГОДЫ

Первая статья с описанием бактериофага вышла в Докладах Парижской академии наук в 1917 г. по представлению доктора Ру (Roux) [28]. В ней д'Эрелль показал способность бактериофага к неограниченному размножению, исследовал его специфичность по отношению к хозяевам и, самое важное, дал интерпретацию фаговых бляшек на газоне бактериальной культуры как единичных колоний бактериофага, а также использовал подсчет бляшек для количественного измерения концентрации бактериофага. Несмотря на многочисленные трудности работы в военное время, к 1921 г. д'Эрелль опубликовал книгу о бактериофагах под громким названием «Бактериофаг и его роль в иммунитете» (Bactériophage et son role dans l'immunité)[29]. В 1926 г. эта книга вышла на русском языке [30]. За короткий период с момента открытия бактериофагов д'Эрелль весьма далеко продвинулся в изучении нового явления. Формирование негативных колоний и зависимость их числа от разведения фага были, по мнению д'Эрелля, четким доказательством корпускулярной природы бактериофага, т.е. того факта, что фаг не имеет действующей концентрации, ибо достаточно единственной частицы вируса, чтобы вызвать лавинообразное размножение (что неизбежно влекло за собой мысль об аналогичной организации и вирусов высших организмов). Более того, проследив динамику роста числа инфекционных центров в инфицированной культуре, д'Эрелль обнаружил, что фаг размножается не непрерывно, а «толчками» [29]. Этот эксперимент, в сущности, соответствует широко известному эксперименту единичного цикла роста, который был вторично предложен Эмори Эллисом два десятилетия спустя.

Д'Эрелль также сообщает о физиологических изменениях (культуральные, ферментативные и антигенные свойства) у бактерий, получивших устойчивость к фагу (видимо, фагоустойчивых мутантов).

Помимо этого, д'Эрелль проделал огромную работу по изучению распространенности явления бактериофагии в природе. Он получил культуры фага к различным бактериям, в основном к возбудителям различных заболеваний из образцов воды, фекалий животных различных видов и иных источников, заложив, таким образом, основы экологической вирусологии.

Само название первой книги д'Эрелля говорит о том, что, по его мнению, фаг был частью защитных механизмов макроорганизма, определявшей выздоровление от дизентерии и, возможно, от иных инфекционных заболеваний. В своих мемуарах, озаглавленных, кстати, как «Странствия одного бактериолога» («Pérégrinations d'un bactériologiste»), д'Эрелль утверждает, что в ходе многочисленных путешествий в 1914–1927 гг. он собрал большой массив доказательств того, что выздоровление от самых различных инфекционных заболеваний людей и животных сопровождается появлением соответствующего бактериофага в их кишечнике, отсутствие же фага являлось, по его мнению, предик-

тором фатального исхода [26]. И именно фаг был, по мнению д'Эрелля, ключевым элементом «настоящего» иммунитета [31].

Идеи д'Эрелля о роли бактериофага в иммунитете вызвали жесткое противостояние с известным бельгийским иммунологом и бактериологом Жюлем Бордэ (Jules Jean-Baptiste Vincent Bordet; 1870–1961), лауреатом Нобелевской премии 1919 г. за открытие системы комплемента [32].). В своей второй монографии, изданной в 1926 г. [33], д'Эрелль назвал работу Бордэ «историей ошибок». По его мнению, теория иммунитета Эрлиха, Мечникова и Бордэ – «это "теория иммунитета лабораторных животных"; она не имеет никакого отношения к реальному положению вещей и, в то же время представляет собой препятствие на пути познания истинных причин выздоровления, и является общественно опасной, поскольку она ведет к принятию профилактических мер, которые бесполезны или вредны» (цит. по Dublanchet [26]).

Вероятно, причиной столь критического отношения к иммунологии и иммунопрофилактике мог быть также опыт работы д'Эрелля в лаборатории по изготовлению вакцин Института Пастера в Париже в годы Первой мировой войны, где в крайней спешке приготовлялись многочисленные убитые вакцины, которые практически не тестировали [26] и, вероятно, в большинстве случаев были действительно неэффективны.

Бордэ, оскорбленный нападками д'Эрелля, присоединился к исследованиям бактериофагов, стараясь доказать несостоятельность взглядов своего оппонента. Он стал также противником самой идеи о том, что фаги представляют собой вирусы, и отстаивал мысль, что фаг – это не более, чем проявление собственной автолитической активности бактерий [1, 34]. В 1921 г. к группе Бордэ присоединился бельгийский микробиолог Андрэ Грациа [André Gratia (1893–1950)], который годом раньше случайно обнаружил (см. ниже) работу Туорта, ранее не привлекшую большого внимания, и в серии экспериментов продемонстрировал, что феномен Туорта и бактериофаг д'Эрелля – это однородные явления. В начале 1920-х гг. Грациа разделял взгляды Бордэ на природу бактериофага, и неудивительно, что полученные им результаты были использованы Бордэ, чтобы не только атаковать концепцию вирусов бактерий, отстаиваемую д'Эреллем, но и поставить под сомнение его приоритет в открытии этого феномена.

Для доказательства своих взглядов Жюль Бордэ и его коллеги развернули масштабную исследовательскую программу и достигли очень существенных фундаментальных результатов [34]. Они впервые описали явление лизогении [35, 36], впервые получили и применили нейтрализующую вирус антисыворотку (McKinley в лаборатории Bordet, [37]), исследовали специфичность ряда фагов к хозяевам и условия, необходимые для успешного роста фага. Тем не менее практически вплоть до окончательного разрешения вопроса в 1940-х гг. с помощью электронной микроскопии, Бордэ считал, что бактериофаг не является вирусом. «Способность образовывать фаги – писал Бордэ – встроена в наследственный аппарат бактерий». С современных позиций это звучит, как определение понятия «лизогения», однако следует учитывать, что для Бордэ и для большинства бактериологов того времени понятие «наследственность» воспринималось иначе, чем сейчас. Бордэ считал образование фага некоторым нормальным физиологическим процессом, возникающим как одно из состояний регуляции обмена веществ клетки. Категории вроде «генетической программы» были вне парадигмы его научного мышления.

С концепцией Бордэ был согласен известный американский биохимик Джон Нортроп (John Howard Northrop (1891–1987), Нобелевский лауреат 1946 г.). Нортроп основывал свою интерпретацию на сходстве кинетики роста концентрации бактериофагов в инфицированной культуре и кинетики накопления ферментов в процессе роста бактерий [38]. Он видел в образовании бактериофага аналогию с автокаталитической активацией ферментов [39], аналогичные аналогии использовал и Бордэ.

Под влиянием авторитета этих двух маститых ученых концепция «размножающегося автолитического фермента», хотя она и требовала больших натяжек для объяснения известных фактов, сделалась преобладающей в 1930-е гг. Так, в заключение своей Крунинской лекции «Теории бактериофага», прочитанной в Лондоне в 1930 г. по приглашению британского Королевского общества [40], Бордэ заявил: «С учетом всех экспериментальных документов не будет ли более рациональным думать, что этот вирус не существует, и что сильное действие бактериофага представляет собой не более чем патологическое преувеличение нормальной функции "клеток", связанной с мутациями, и что этот лизис на самом деле, как я чувствую себя в праве утверждать после десяти лет, прошедших с момента моего первого, совместного с Чиука исследования, <есть> трансмиссивный автолиз».

Тем не менее, ряд ученых продолжали придерживаться вирусной теории д'Эрелля. Интересно, что, помимо д'Эрелля, активным оппонентом Бордэ был другой бельгийский ученый

Ришар Брюиног (Richard Bruynoghe, 1881–1957). Профессор Брюиног был директором Института бактериологии в Лёвене, расположенном в окрестностях Брюсселя, где Бордэ возглавлял основанный им Брюссельский Институт Пастера. Оба эти исследователя были членами Бельгийского биологического общества, на заседаниях которого они и их ученики регулярно делали доклады, полемизируя по вопросу природы бактериофага. К сожалению, работы Брюинога не были опубликованы в более авторитетных, чем доклады этого общества, изданиях.

Поразительно, что обе группы практически полностью подтверждали экспериментальные результаты друг друга (см. обзор [34]), но расходились в их интерпретации. Так, обе группы наблюдали образование вариантов бактерий, устойчивых к фагам, и феномен адаптации фага к тем или иным штаммам хозяев, продемонстрировали специфичность фаг-нейтрализующих сывороток по отношению к расам фага, против которых они были получены, и сохранение этой специфичности в отношении фага, адаптированного к росту на другом штамме-хозяине.

Несмотря на то что многие данные свидетельствовали о том, что фаг имеет сложно организованную структуру, и что против одного и того же вида бактерий можно получить структурно различающиеся бактериофаги, группа Бордэ настаивала на своей теории. Любопытно, что сам д'Эрелль как минимум до 1930-х гг. продолжал придерживаться мнения, что бактериофаг – это единая сущность, обитающая в кишечнике людей и животных, которая лишь приспосабливается к разным видам бактерий, и именно эта адаптация фага лежала, по его мнению, в основе иммунного ответа, ведущего к выздоровлению [31].

Борде также активно протестовал против идеи корпускулярной природы фага, считая, что формирование бляшек, обнаруженое д'Эреллем может быть объяснено разведением чувствительных бактерий. По его теории, бактериолитический «принцип» представлял собой коллоид или даже растворимое соединение, эффективно адсорбирующееся на обломки лизированных клеток, из-за чего бактериофаг не проходил через ультратонкие фильтры. Отдельные, наиболее восприимчивые клетки культуры, запускали под его воздействием процесс автолиза, который оказывался сопряжен с синтезом новых порций «принципа» и приводил к образованию бляшек [40].

Оппонируя Бордэ, стажер Брюинога Рене Аппельман применил в 1921 г. метод предельных разведений, известный в наше время как титрование фага по Аппельману [41], и показал, что при максимальном значении разведения лизис наблюдается лишь в части параллельных пробирок, что совместимо только с идеей существования фага в виде отдельных частиц. Однако этот аргумент также не убедил Бордэ. В итоге этих многолетних дебатов профессор Брюиног, по-видимому, решил, что для него вопрос является абсолютно ясным, а упорство его оппонента основано на иррациональных мотивах. С 1927 г. Брюиног прекратил работы по бактериофагам [34].

Несмотря на ложные теоретические посылки Бордэ, его интерес к бактериофагам существенно ускорил прогресс их исследований и привлек в эту сферу ряд талантливых молодых бельгийских ученых.

Андре Грациа, молодой бельгийский микробиолог, начал свою карьеру в лаборатории физиологии Свободного университета Брюсселя, где Бордэ занимал в то время пост профессора бактериологии.

В 1920 г. Грациа отправился для работы в Рокфеллеровский институт в Нью-Йорке, где его коллега Петер Олицкий порекомендовал Грациа статью о менингококках, вышедшую в 1915 г. Поскольку Олицкий не мог вспомнить точной ссылки, Грациа вынужден был пролистать весь том журнала за 1915 г. и наткнулся на статью Туорта [42]. Он приступил к собственным исследованиям, и вскоре пришел к выводу, что феномен Туорта идентичен бактериофагу, описанному д'Эреллем [35, 43]. Таким образом, Андре Грациа оказался первым исследователем бактериофагов в США. По-видимому, он был одним из прототипов сложного характера Мартина Эроусмита – главного героя романа Синклера Льюиса «Эроусмит» (Пулитцеровская премия 1926 г.), молодого микробиолога, работающего в 1920-е гг. в Америке над исследованием бактериофагов и проблемами фаговой терапии [42] (предположительно, в числе прототипов этого героя был также и Ф. д'Эрелль; [44]). Эта тематика настолько увлекла Грациа, что он продолжал заниматься бактериофагами в течение всей своей оставшейся научной карьеры. После работы в Нью-Йорке Грациа вернулся в Европу, в лабораторию Бордэ, где продолжил исследования бактериофагов. В начале 1920-х гг. он в целом разделял теоретические концепции Бордэ, но впоследствии постепенно убедился в правоте воззрений д'Эрелля [42].

Работы Андре Грациа предвосхитили целый ряд важных открытий в биологии бактериофагов (подробнее см. обзор [42]). Так, во время своей работы в Рокфеллеровском институте Грациа обнаружил диссоциацию (фазовую вариа-

цию?) культуры *Escherichia coli* (в то время *Bacillus coli*) на два фенотипически различающихся варианта S и R (от слов sensitive and resistant, не путать с диссоциацией smooth – rough). Культуры отличались по степени восприимчивости к бактериофагу, который использовал исследователь. При этом Грациа путем селекции удалось также получить фаг, более эффективный против штамма R, который имел также отличия по морфологии бляшек и по спектру хозяев [35, 43]. Таким образом, Грациа обнаружил образование наследуемых вариаций (мутаций или фазовых вариантов?) фагочувствительности бактерий, возникающих до контакта с вирусом. Кроме того, он впервые описал наследуемые изменения (мутации по спектру хозяев) у самого бактериофага. Однако сам Андрэ Грациа пришел к подобным интерпретациям существенно позже [42, 45]. В 1921 г. он придерживался взглядов Бордэ. Вместо термина «бактериофаг» он использует термин «литический принцип», принятый школой Бордэ. Более того, описанная выше альтернативная концепция, объясняющая возникновение бляшек, была сформулирована и обоснована именно в его работе [35]. Для ее доказательства Грация поставил логичный эксперимент, показавший, что число бляшек, образующихся при посеве одинаковой дозы колифага, зависит от разведения культуры, используемой для образования бактериального газона. Этот странный результат, впоследствии опровергнутый в работе Элиса и Дельбрюка (см. ниже), вероятно, объяснялся физиологическим состоянием исходной чрезмерно сконцентрированной суспензии и слишком широким диапазоном ее разведения.

Любопытно, что результаты Грациа были совершенно иначе интерпретированы американским генетиком Германом Мёллером (Hermann Joseph Muller (1890–1967)), который в 1922 г. писал: «...Грациа обнаружил, что эта субстанция “бактериофаг” посредством соответствующей обработки на других бактериях может изменяться ..., сохраняя свою способность к самовоспроизведению.

Эти две субстанции – субстанция д’Эрелля и гены – обе должны обладать этим наиболее замечательным свойством наследуемой вариабельности или «мутабильности ... если тельца д’Эрелля и в самом деле гены, фундаментально такие же, как и наши хромосомные гены, это дало бы нам совершенно новое направление, чтобы атаковать проблему гена... Было бы слишком поспешно назвать эти тельца генами, но мы должны признать, что в настоящее время мы не знаем ни одного свойства, которое различало бы гены и их. Таким образом, мы не можем категорически отрицать, что мы, возможно, сможем растирать гены в ступке или запекать их в печи» [46].

Это высказывание Мёллера является, по-видимому, первой формулировкой близкой к современной концепции вируса, как трансмиссивной генетической программы, приводящей к собственному воспроизведению. Идеи Мёллера могли повлиять на Макса Дельбрюка (см. ниже), с которым Мёллер познакомился во время своей работы в Берлине в лаборатории Тимофеева-Ресовского [47].

К сожалению, большинство других работ Андре Грациа не были замечены современниками. Его имя запомнилось главным образом в связи с усовершенствованием метода посева фага на плотных средах, заключавшегося в использовании тонкого слоя мягкого агара поверх обычного агара в чашках – так называемое титрование фага по Грациа.

Не сразу были замечены и данные венгерского биохимика Макса Шлезингера (Max Schlesinger; 1904–1937), который впервые получил очищенный препарат бактериофага путем фильтрования через фильтры с различным размером пор и осаждения на ультрацентрифуге и доказал, что бактериофаг состоит из белка и ДНК (различить ДНК и РНК он смог с помощью реакции Фельгена), что совпадало с составом хромосом, выделяемых из высших организмов [48]. Интересно, что М. Шлезингер также одним из первых провел в 1932 г. точные количественные исследования кинетики адсорбции бактериофага *E. coli,* продемонстрировав, что эта реакция в первом приближении соответствует кинетике второго порядка (Schlesinger 1932, цит. по сборнику Stent [1]), а также оценил размерный класс частиц бактериофагов (~0,1 мкм).

Однако полученные в 1930-е гг. оценки размеров фаговых частиц с помощью ультрафильтрации и с помощью осаждения на скоростных центрифугах [49], также не могли быть напрямую интерпретированы, а первые фотографии фаговых частиц, полученные в 1939 г. Гельмутом и Эрнстом Руска (Helmut Ruska 1908–1973, Ernst Ruska 1906–1988) [50], см. также обзор Kruger et al. [51], были опубликованы в нацистской Германии, и вследствие этого оказались не доступны мировому научному сообществу.

Таким образом, несмотря на установление ряда ключевых свойств вирусов бактерий и появление верных теоретических концепций, к концу 1930 гг. консенсус по вопросу о физической природе бактериофага не был достигнут. Само существование различных видов бактериофагов подвергалось сомнению д’Эреллем, кото-

рый считал, что различные расы фага были фенотипическими вариантами, возникающими в результате адаптации универсального *Bacteriophagum intestinale* [31].

Весьма примечательно, что в ходе описанной выше научной дискуссии все ключевые участники пытались описать природу бактериофага по аналогии с ранее успешно исследованными ими системами. Так, очевидно, Бордэ и Нортроп видели за явлением бактериофагии механизм, похожий на изученные ими ранее ферментативные системы (активации комплемента, а также тромбина и протеолитической активации трипсина соответственно). Хотя взгляды д'Эрелля были несколько ближе к истине, он также оказался в плену своей теории ультрамикроскопического микроба, клетки «в гистологическом смысле слова» [26], и не воспринимал серьезно гипотезу трансмиссивного гена.

Любопытно также, что несмотря на неопределенность по вопросу о природе бактериофагов, их фундаментальное свойство проявлять высокую степень специфичности к определенным видам и штаммам бактерий хозяев было не только в должной мере доказано, но и стало активно применяться для быстрого и высокоразрешающего типирования изолятов бактерий в исследовательской и эпидемиологической практике. Вопреки распространенному убеждению, технология фаготипирования была впервые создана не в Канаде (1936 г.) и не в Англии (1940 г.), а в Веймарской республике в 1920-е гг. [52], при этом немецкие микробиологи параллельно работали как над фундаментальной проблемой фага, так и над совершенствованием его практического применения.

ОТКРЫТИЕ И ФОРМИРОВАНИЕ КОНЦЕПЦИИ ЛИЗОГЕНИИ

История открытия феномена лизогении и ранних исследований, приведших к расшифровке сути данного явления, чрезвычайно подробно описана одним из наиболее известных участников этих событий Андре Львовым (André Michel Lwoff (1902–1994)) [53], здесь же мы упомянем лишь основные вехи этого пути. В соответствии с реконструкцией Львова, открытие феномена лизогении прошло через четыре основные стадии.

1) Явление тесной ассоциации бактерий и бактериофагов в перевиваемой культуре впервые описано Бордэ и Чиука в 1920–1921 гг. [36] (д'Эрелль также наблюдал аналогичное явление [29], но не придал ему существенного значения, считая, что имеет дело со смешанной культурой бактерий и фагов, в современной терминологии carrier state). Одновременно о получении выделяющей фаг культуры сообщили Otto и Munter [54, 55].

2) В 1922 г. Bail [56] предлагает теорию осколков (splitter theory), в соответствии с которой фаги представляют собой обломки разрушающихся бактерий, способные индуцировать разрушение новых клеток. Эту теорию критиковал д'Эрелль [53].

3) В 1924 г. Gildmeister и Herzberg [57] приводят доказательства того, что лизогенный штамм *E. coli* 88 сохраняет способность выделять фаг в отсутствии контакта с внеклеточным фагом. Их выводы в 1925 г. подтверждает Bail [58], который провел данную культуру через 6 последовательных выделений отдельной колонии, но она тем не менее сохранила способность к продукции фага. К выводу о том, что все клоны данной культуры сохраняют способность выделять фаг, пришел также Bordet [59]. Эти заключения были очень существенным достижением в начале 1920-х гг., поскольку примерно в это же время происходила смена парадигмы в микробиологии. Если раньше в качестве единичного организма воспринималась культура микроба, то в этот период в центре мышления исследователей постепенно оказывалась микробная клетка [12].
4) Работавший в лаборатории Бордэ Е. МакКинли получил сыворотку против бактериофага из *E. coli* 88 и показал, что обработка культуры этим фагом не уничтожает способности ее субклонов к продукции бактериофага [37].

Таким образом, к 1925 г. Бэйл и Бордэ параллельно пришли к утверждению, что существуют бактериальные культуры, все субклоны которых в течение неограниченного числа поколений сохраняют способность продуцировать фаг. Они также показали возможность получить лизогенные культуры из нелизогенных, обрабатывая их соответствующим бактериофагом. Бордэ четко разграничил понятия «сильного» и «слабого» литических принципов (principes forts et faibles), которые примерно соответствуют современным понятиям «вирулентный» и «умеренный» фаг. С этого момента явление лизогении можно считать открытым и четко дифференцированным от состояния носительства, однако для расшифровки его биологической сущности потребовалось еще более четверти века усилий.

Данной проблемой занимались многочисленные исследователи (в том числе Ф.М. Бёрнет (F.M. Burnet), М. МакКи (M. McKie), О. Бэйл (O. Bail), Дж. Х. Нортроп (J. H. Northrop) и другие [53]. Bordet и Renaux [60] в своей работе 1928 г. утверждали, что способность к продукции бактериофага «вставлена» в наследственный аппа-

рат бактерии. Однако несмотря на удивительную точность этого выражения с позиций современного знания [53], школа Бордэ была крайне далека от верного понимания природы бактериофага в целом и лизогении в частности. Для Бордэ наследственность бактерий представлялась синонимом гомеостаза клеток, идеи об отдельном материальном носителе наследственности были в это время ему чужды.

Основной загадкой лизогенных культур было то, что свободный фаг присутствовал в них в количестве на несколько порядков меньшем, чем бактериальные клетки, тем не менее каждая такая клетка могла дать начало лизогенному клону. Вопрос о том, в какой форме фаг присутствует в лизогенных клетках, оставался неразрешенным. Австралийские исследователи Burnet и McKie [61] в 1929 г. установили, что при искусственном разрушении лизогенных клеток с помощью другого бактериофага в них не обнаруживается инфекционных частиц умеренного фага. Более того, было выяснено, что при лизогенизации нелизогенных клеток бактериофагом полученные лизогены продуцируют именно тот фаг, который был использован для лизогенизации. Основываясь на этих данных, Бёрнет (Sir Frank Macfarlane Burnet (1899–1985), Нобелевский лауреат 1960 г.) сформулировал теорию зародыша фага (anlage), который присутствует во всех клетках культуры, но лишь в некоторых может быть активирован (подробнее об исследованиях бактериофагов М. Бёрнетом см. обзор [62]). Однако австралийская школа склонялась к тому, что зародыш представляет собой фактически бактериофаг, активность которого блокирована каким-то механизмом или лигандом [63].

В 1931 г. датский микробиолог Dooren de Jong, E. D. [64] сообщил о получении из лизогенного штамма *Bacillus megaterium* 899 нелизогенного и неспорообразующего мутанта, чувствительного к фагу, выделяемому исходным штаммом. Исследователь установил, что споры лизогена, прогретые при 100 °C, дают начало лизогенным клеткам, хотя сам фаг инактивировался в этих условиях. Автор пришел к заключению, что фаг не содержится как таковой в лизогенных бактериях, но может продуцироваться ими (надо отметить, что это в целом верное заключение было недостаточно обосновано, так как структуры вегетативной клетки бацилл также разрушаются нагреванием, но они становятся термоустойчивыми внутри спор).

Гораздо ближе к истинному объяснению лизогении подошли французский ученый русского происхождения Евгений Вольман (Eugène Wollman; 1883–1943) и его жена Элизабет Вольман, работавшие в Институте Пастера в Париже. Еще в 1925 г. Е. Вольман впервые высказал предположение, что бактерии могут иметь гены, и что эти гены могут в некоторых случаях передаваться через внешнюю среду [53], а в 1928 г. он высказал предположение, что и лизогенизация бактерий происходит в результате передачи им соответствующих генов [65].

С 1934 г., действуя в рамках своей концепции, Вольманы приступили к работе с культурой *Bacillus megaterium* 899. Они подтвердили, что способность продуцировать фаг присуща потомству любой клетки данной культуры, но при разрушении клеток лизоцимом активного бактериофага из них не выделяется [66, 67]. Они также сформулировали концепцию двух фаз цикла соответствующего бактериофага – литической, проявляющейся в продуктивной инфекции клеток, и скрытой, в которой фаг находится в составе лизогенных бактерий. Эти же ученые предложили термин «умеренный фаг» для обозначения бактериофага, способного к лизогении [68]. На основании косвенных данных они предполагали, что выделение фага лизогеном сопряжено с лизисом клетки. Вольманы продолжали работать над этой темой в оккупированном (после 1940 г.) немецкими войсками Париже, но публикация новых результатов была невозможна. Для окончательного разрешения вопроса о способе продукции фага они стали использовать микроманипулятор, впервые переведя работу с фагами на уровень изучения отдельных клеток [53]. Но эта работа не была ими завершена – в 1943 г. Эжен и Элизабет Вольман, имевшие еврейское происхождение, были арестованы нацистами в Институте Пастера и отправлены в лагерь смерти Аушвиц, где и погибли.

В 1950-е гг. исследования лизогении на этом же объекте были продолжены Андре Львовым (см. выше), который в предвоенные годы близко дружил с Вольманами, был знаком с их идеями, но в тот момент не проявил к их работе особого интереса. Вместе с Антуанет Гутман Львов использовал непосредственное наблюдение за микроколониями клеток в маленьких каплях среды с помощью светового микроскопа. Периодически исследователи производили высев материала из капель для обнаружения фаговых бляшек на газоне чувствительной бактериальной культуры. В результате им удалось показать, что лишь при внезапном лизисе одной из клеток в капле появлялось ~100 частиц свободного бактериофага, тогда как в каплях, где все клетки продолжали делиться, фаговые частицы полностью отсутствовали, иногда и в нескольких пассажах [69]. Это однозначно свидетельствовало, что передача способности к продукции фага

при пассажах лизогенной культуры фага не происходит путем реинфекции чувствительных клеток, как предполагал М. Дельбрюк, но является результатом тесной ассоциации фага с генетическим аппаратом клетки. Более того, генетическая программа, реализуемая в клетках, которые продуцируют фаг, отличается от программы большинства других клеток лизогенной культуры. Львов и Гутман предложили термин «профаг» для обозначения гипотетической неинфекционной формы бактериофага в лизогенной клетке.

В 1950 г. Lwoff et al. [70] публикуют первую работу, где они описывают стимуляцию продукции фага лизогенной культурой при ультрафиолетовом облучении – индукцию фага. В результате этих и ряда иных работ Львов сформулировал описание лизогенного цикла бактериофага, близкое к современному. За эти работы в 1965 г. Андре Львов был удостоен Нобелевской премии.

Окончательное же установление природы профага стало возможным преимущественно в результате работ по исследованию бактериофага λ, обнаруженного Э. Ледерберг в лаборатории Дж. Ледерберга. История исследований бактериофага λ подробно описана современниками этих событий (см. обзоры Hershey and Duve, [71], A. Campbell в книге Херши [72], см. также обзоры [73–75]). Эти события были связаны с первыми шагами молекулярной генетики бактерий. В 1946 г. Lederberg и Tatum (Joshua Lederberg (1925–2008), Нобелевский лауреат 1958 г.) [76] открыли рекомбинацию (в современных терминах – конъюгацию) у штамма *E. coli* K-12, выделенного еще в 1922 г. из клинического образца в Калифорнии. Это дало возможность впервые применить методологию генетического анализа для исследования бактерий. После 1953 г., когда была открыта первая конъюгативная плазмида – F-фактор – и получены Hfr-штаммы (high frequency of recombination), в которых с высокой частотой происходил конъюгационный перенос хромосомы (за счет интеграции F-фактора), эффективность генетического анализа резко возросла (см. ссылки в работе [74]). Однако данная методология требовала наличия большого числа фенотипически различимых мутантов, на скрещивании которых строилась работа по картированию хромосомы бактерий и другие исследования. Получение таких мутантов именно того штамма *E. coli* K-12, на котором была показана возможность производить скрещивания, было весьма актуальным. Э. Ледерберг облучала культуру этого штамма ультрафиолетом с целью последующего отбора ауксотрофных мутантов. Однако оказалось, что один из полученных ей штаммов при контакте с родительским штаммом лизировался. Оказалось, что исходный штамм был лизогенным, и Э. Ледерберг удалось случайно получить излеченную от профага культуру, ставшую чувствительной к данному фагу [77]. Получение экспериментальной системы, позволявшей исследовать лизогению с помощью методологии генетического анализа, обеспечило быстрый прогресс исследований, которые мы опишем здесь лишь кратко (подробнее см. обзоры [74, 78]). В результате этой работы было установлено, что профаг λ не является цитоплазматическим фактором, но тесно сцеплен с собственным хромосомным маркером ферментации галактозы *gal* [79]. Позднее было показано, что профаг не просто прикреплен к хромосоме бактерии в районе гена *gal*, но встроен между генами *gal* и *bio* (синтез биотина), и в лизогенных клетках генетическое расстояние между этими маркерами увеличено. Наконец, в 1957 г. Ф. Жакоб и Э. Вольман (сын Евгения и Элизабет Вольманов, упомянутых выше) обнаружили, что при конъюгационном переносе профага из лизогенного донора в нелизогенную клетку-реципиент с высокой частотой происходит индукция и гибель реципиента с высвобождением фагового потомства [80]. Этот эффект исходно был назван «эротической индукцией», но затем из соображений приличия переименован в зиготную индукцию [74]. Зиготная индукция однозначно свидетельствовала о наличии в лизогенных клетках цитоплазматического фактора, репрессора, который поддерживает профаг в молчащем состоянии. Но так как при конъюгации транспортируется лишь ДНК, в клетке реципиента профаг оказывается дерепрессирован. Спустя 10 лет Ptashne [81] смог изолировать этот белок из лизогенных клеток, используя его специфическое связывание с ДНК фага λ. Исследования регуляции жизненного цикла фага λ [82] наряду с изучением лактозного оперона легли в основу первых представлений о контроле экспрессии генов.

Интересно, что классическая схема интеграции – эксцизии фага λ с использованием кольцевого интермедиата была предложена Campbell лишь в 1962 году. Позже он описал историю этого события [78]. Эта схема была последним существенным элементом, после которого концепцию лизогении, близкую к современным представлениям, можно считать сформированной.

ОТКРЫТИЕ ФАГОВОЙ ТРАНСДУКЦИИ

Практически одновременно с обнаружением фага λ в лаборатории Дж. Ледерберга в 1951 г. Н. Циндером (Norton Zinder, 1928–2012) было от-

крыто явление трансдукции. История этого открытия описана Zinder в обзоре [83]. Работа Циндера была связана с попытками картирования хромосомы *Salmonella typhimurium* с помощью конъюгации. Он получил 22 штамма *S. typhimurium* из шведской лаборатории К. Лиллеенгена и отобрал по несколько двойных ауксотрофных мутантов для каждого из этих штаммов. После контакта различных пар мутантов производили отбор потенциальных рекомбинантов (транс-конъюгантов) по возврату к прототрофности по маркерам одного из штаммов (реципиента). В попытках найти подходящие конъюгационные пары Циндер обнаружил, что скрещивания удаются только между мутантами штаммов LT-2 и LT-22. Однако в отличие от экспериментов на *E. coli* K-12, в которых происходила одновременно передача значительного числа хромосомных маркеров, в скрещиваниях Циндера переносился каждый раз лишь один маркер, причем донором оказывался всегда штамм LT-22. При первых же экспериментах перенос маркера можно было наблюдать лишь для одной из исследованных пар штаммов. Для выяснения необходим ли для данного переноса прямой контакт клеток Циндер и Ледерберг использовали установку, которая была ранее создана в их лаборатории для исследования необходимости прямого контакта клеток при конъюгации у *E. coli*. Прибор представлял собой U-образную стеклянную трубку, разделенную посередине фарфоровой мембраной с диаметром пор меньшим, чем размер бактериальных клеток. Суспензии клеток штаммов донора и реципиента помещали с разных сторон мембраны. После некоторого времени инкубации культуральную среду продавливали сжатым воздухом из одной половины трубки в другую и обратно, при этом клетки бактерий оставались в своих отсеках. В отличие от конъюгации у *E. coli*, в исследуемой Циндером системе для передачи маркера было достаточно контакта с культуральной жидкостью культуры донора. Поиск агента, переносящего мутацию, привел к обнаружению в супернатанте донора бактериофага, способного образовывать бляшки на штамме реципиенте. Это оказался умеренный фаг P22. Особенности механизма упаковки ДНК фага P22 приводят к частой ошибочной упаковке в некоторые вирионы случайных фрагментов генома хозяина с образованием трансдуцирующих частиц. Поэтому при каждом акте трансдукции переносится лишь небольшой фрагмент хромосомы, содержащий не более одного маркера. Такое явление получило название общей трансдукции. В дальнейшем при попытке исследовать возможность трансдукции фагом λ, Morse et al. [84] обнаружили, что перенести удается только ген *gal*, рядом с которым происходит интеграция профага. Это явление, получившее название специфической трансдукции, связано с тем, что с небольшой вероятностью вырезание генома профага происходит неправильно. Дальнейшее исследование специфической трансдукции привело к существенному прогрессу в понимании механизмов сайт-специфической рекомбинации при интеграции и эксцизии фага λ [73, 74, 78].

ВЗЛЕТ И ПАДЕНИЕ ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ В 1920–1940 ГОДЫ

Совершенно логично, что д'Эрелль, считавший фаги частью естественного иммунитета [26, 29, 85] попытался усилить гипотетическое естественное лечебное действие фага путем введения больному его препаратов, полученных *in vitro*. Эта технология приобрела с его легкой руки большую популярность в 1920–1930 гг., однако по различным причинам была практически оставлена западной медициной к концу 1940-х гг., хотя продолжала использоваться в СССР и некоторых других странах. В настоящее время фаговая терапия (ФТ) вновь рассматривается, как одно из возможных решений кризиса, связанного с распространением резистентности к антибиотикам. Благодаря этому, первый период фаговой терапии уже стал предметом большого числа исторических работ и обзоров [86–91] и продолжает активно исследоваться в настоящее время. Здесь мы приведем лишь основные вехи сложной и противоречивой истории ФТ.

В 1919 г., практически сразу же после открытия бактериофага, д'Эрелль провел обширное и даже по современным меркам хорошо контролируемое полевое исследование профилактической и лечебной эффективности бактериофагов против куриной холеры (инфекции, вызванной *Salmonella gallinarum*), которая приводила к большим экономическим потерям французских птицеводов. Он провел исследования по использованию бактериофага для борьбы с куриной холерой. В том же году под руководством проф. Виктора Анри Гутинеля (Victor Henri Hutinel (1849–1933)), директора детской больницы Hôpital des Enfants-Malades в Париже, бактериофаг был применен для лечения дизентерии у ребенка, закончившейся после этого быстрым выздоровлением. Перед этим д'Эрелль, члены его семьи, сотрудники, а также некоторые врачи принимали фаг в значительно больших количествах и убедились в отсутствии побочных эффектов. Д'Эрелль также вводил себе подкожно 1 мл фагового лизата, что также не вызвало ни-

каких нежелательных эффектов, после чего инъекции были выполнены его жене и дочерям, и также без малейших негативных последствий [33, 87]. Это наблюдение особенно удивительно, поскольку лизат никак не был очищен от компонентов разрушенных клеток, в частности от липополисахарида, способного вызывать повышение температуры и даже токсический шок! Тем не менее по меркам начала прошлого столетия проведенная оценка безопасности препарата была совершенно достаточна, что позволило пойти на применение бактериофага у больного ребенка.

Разработанная д'Эрелем фаговая терапия стала вторым этиотропным средством антибактериальной терапии после сальварсана Пауля Эрлиха (Paul Ehrlich, 1854–1915), токсичного соединения мышьяка, которое тем не менее весьма успешно употреблялось с 1910 г. для лечения сифилиса [92]. В дальнейшем д'Эрелль совершает несколько путешествий и применяет фаговую терапию для лечения вызванной *Pasteurella multocida* геморрагической лихорадки крупного рогатого скота в Индокитае, бубонной чумы – у четырех заболевших на борту судна, проходившего через Суэцкий канал, а также для лечения и профилактики холеры в Индии в 1927–1931 гг. [26, 33, 87]. В последнем случае это было масштабное исследование, развернувшееся в провинции Асам. Были выбраны два городка, Наогаон и Габигандж, которые были сопоставимы по своим размерам и условиям жизни в них. В Наогаоне в 1928 г. сотрудники д'Эрелля раздавали сначала ограниченные, а затем, с 1929 г., и весьма значительные количества фагового препарата. Со второй половины 1929 и до 1935 г. в Наогаоне вспышки холеры не наблюдались, тогда как в контрольном Габигандже они продолжались с обычной периодичностью и интенсивностью. Однако с 1932 г. индийское правительство распорядилось раздавать препараты и населению Габиганджа. И хотя в оставшиеся 3 года исследования смертность от холеры в данном регионе практически сошла на нет (при продолжавшихся вспышках в соседних провинциях), отказ от контрольной группы значительно снизил научную ценность полученного результата [93–95]. История этого реального исследования поразительно совпала с драматической историей вымышленного эксперимента по профилактике и лечению чумы с помощью фагов, который осуществил герой романа С. Льюиса доктор Мартин Эроусмит, также вынужденный нарушить схему эксперимента под давлением обстоятельств. Как ни удивительно, роман «Эроусмит» вышел в 1925 г., за два года до начала холерной эпопеи Феликса д'Эрелля.

К началу 1930-х гг., благодаря энтузиазму д'Эрелля и его сотрудников, ФТ приобрела большую популярность во всем мире, причем несколько ведущих фармацевтических компаний во Франции, Англии и США начали продавать фаговые препараты [87]. Производство на одной из этих компаний, «Les laboratoires Robert and Carriere», в Париже было организовано самим д'Эреллем перед его отбытием в США в 1928 г., где он получил пост профессора Йельского университета [26]. Хотя д'Эрелль придавал большое значение правильному выбору и приготовлению лечебных бактериофагов [96, 97] и корректности их рекламы, его деловые партнеры нарушили соответствующие обязательства [26]. Аналогичные проблемы с поддержанием качества наблюдались и у других производителей, что в итоге было одним из факторов, приведших к дискредитации ФТ к концу 1930-х гг. В 1934 г. по заказу Американской медицинской ассоциации в ее журнале «*JAMA*» был опубликован подробный обзор литературы по фаговой терапии, написанный двумя Йельскими профессорами Монро Итоном (Monroe Eaton) и Стэнхопом Бейн-Джонсом (Stanhope Bayne-Jones) [98]. Авторы отмечали, что имеются как свидетельства высокой эффективности ФТ, так и сообщения о ее неэффективности. В последующих двух обзорах, заказанных этим журналом и вышедших в 1941 и 1945 гг. [99, 100], авторы также отмечали противоречивость результатов ФТ, при этом во всех трех работах обсуждалось несоответствие между мощным действием бактериофагов *in vitro* и их не всегда достаточной эффективностью *in vivo*.

Хотя по своим выводам данные обзоры могли бы скорее послужить основанием для дальнейших исследований, появившиеся на рынке сульфаниламидные препараты, а затем и первые антибиотики [92] вызывали гораздо больший энтузиазм медицинского сообщества. По-видимому, некоторую роль в подрыве доверия к ФТ сыграли также, активно пропагандируемые д'Эреллем, его «еретические» взгляды на фаги как ключевой компонент естественного иммунитета [26, 85], которые вступали в противоречие с массивом данных активно развивающейся иммунологии.

Одновременно с описанными событиями в Европе и США, ФТ развивалась в Советском Союзе. К сожалению, большая часть этих исследований не была отражена в публикациях в научных журналах, оставшись на страницах различных сборников, отчетов и монографий, труднодоступных современным исследователям. В значительной мере история ФТ в СССР до 1955 г. реконструирована в исследовании D. Myelnikov [89].

Первые сообщения о выделении бактериофагов в СССР датируются 1922 г., а с 1929 г. в Харькове М. Мельником и И. Ручко развернута исследовательская программа по лечебному и терапевтическому применению фагов против дизентерии [89]. В 1933 г. С. Казарновская опубликовала первую в СССР монографию по бактериофагии (не считая перевода первой книги д'Эрелля, вышедшего в 1926 г.) [101].

В 1930-е гг. в той или иной степени фаговые исследования были развернуты более, чем в десятке советских институтов от Минска и до Хабаровска. Одним из важнейших центров стал институт в Тбилиси. Его создание связано с деятельностью талантливого микробиолога Г. Элиавы (подробнее биографию Элиавы см. на сайте https://www.multispecies.org/copy-of-giorgi-and-felix-pt2). Этот ученый дважды стажировался в Институте Пастера в Париже, где он работал совместно с д'Эреллем, а в начале 1930-х гг. добился от советского правительства приглашения д'Эреллю приехать работать в СССР. В 1933–1935 гг. д'Эрелль действительно дважды посетил СССР [26, 89, 91]. Элиава смог также добиться решения о создании нового института, строительство которого началось в Тбилиси. Однако в 1937 г. Элиава был арестован по нелепому обвинению во вредительстве и впоследствии расстрелян. Такая же участь постигла и упомянутых выше харьковских исследователей М. Мельника и И. Ручко. Ф. д'Эрелль более не возвращался в СССР. Тем не менее новый институт в Тбилиси был достроен и начал работу в 1939 г. Ставшее одним из главных центров фаговой терапии в СССР, это учреждение существует и поныне в Грузии, носит название «Научно-исследовательский институт бактериофага, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиавы» и является одним из мировых центров практической фаговой терапии.

В годы Второй мировой войны работы по ФТ активно вели в основном в интересах военной медицины. Специальные бригады хирургов направляли во фронтовые госпитали для исследования эффективности фаговой терапии для профилактики и лечения раневых инфекций, уносивших жизни огромного количества солдат и офицеров. Ключевую роль в этих работах сыграли группы доктора М.П. Покровской из Ленинграда (исходно ее работа была начата на противочумной станции в Ставрополе) и проф. А.П. Цулукидзе из Тбилисского института [102, 103]. Эти исследования дали положительные результаты. Производство фаговых препаратов развертывали даже в непосредственной близости к линии фронта. Так, Зинаида Виссарионовна Ермольева (1898–1974), более известная как автор советской версии пенициллина (названного ей крустозином), организовала производство фагов в осажденном Сталинграде. Интересно, что Ермольева стала прототипом Татьяны Власенковой – главной героини романа В. Каверина «Открытая книга», завершенного в 1956 г. Сюжет этого произведения во многом перекликается с романом «Эроусмит» Синклера Льюиса, однако примечательно, что, в отличие от своего реального прототипа, героиня В. Каверина не участвовала в работе с бактериофагами. По-видимому, это было отражением научной моды того периода, когда интерес к ФТ резко упал даже у советских микробиологов. В частности, сама З. Ермольева с конца 1940-х гг. полностью переключилась на исследования антибиотиков [89].

Работы по ФТ были продолжены и в послевоенное время. По мнению британского историка Д. Мельникова (2018), легкое принятие и последующее сохранение ФТ в СССР было связано с тем, что идеология этой терапии, и даже своеобразные теории иммунитета Ф. д'Эрелля были созвучны экологической направленности русской микробиологической школы, в том числе и школы медицинской микробиологии. Возможно, определенную роль сыграл и плановый характер советской экономики, при котором исследовательские и производственные задачи перекочевывали из плана в план, и требовалось проявление чьей-то политической воли, чтобы отказаться от тех или иных направлений. Исследовательская работа в области ФТ в 1950–1990 гг. преимущественно сводилась к разработке новых лекарственных форм и клиническому тестированию бактериофагов. Так, в конце 1960-х гг. Солодовниковым с соавт. были проведены несколько масштабных и хорошо контролируемых экспериментов по изучению эффективности сухого дизентерийного бактериофага как средства профилактики в детских коллективах [104–106]. Однако, насколько известно автору, существенных попыток усовершенствования основ ФТ (например, изучения фармакокинетики, исследования возникновения резистентных мутантов и т.д.) в СССР не осуществлялось. Производство фаговых препаратов сохранилось до наших дней, и они присутствуют в аптеках в России и в Грузии. Интересно, что сохранение практической ФТ в СССР и в некоторых странах Восточной Европы (в Польше и Чехословакии) сыграло свою роль в окончательном отказе от ФТ на Западе. Эта технология стала восприниматься как медицина, связанная с коммунистическими или с тоталитарными режимами (так, например, фаговые препараты были обнаружены в трофейном медицинском оснащении войск Третьего Рейха

[87]). Определенное значение имели и иные социально-психологические факторы [107].

На Западе производство фаговых препаратов полностью прекратилось в 1970 гг. [87]. Однако с конца 1990 гг. наблюдается возрождение интереса к этой технологии в связи с критическим ростом полирезистентных бактериальных инфекций.

РАБОТА ФАГОВОЙ ГРУППЫ И РОЖДЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Зарождение молекулярной генетики бактериофагов тесно связано с деятельностью Макса Дельбрюка (Max Ludwig Henning Delbruck; 1906–1981) в Калтехе в 1938–1954-х гг., а также работами Фаговой группы – неформального объединения ученых, лидером которого был Дельбрюк [47]. В 1969 г. трем первым участникам Фаговой группы – М. Дельбрюку, Сальвадору Луриа (Salvador Edward Luria (1912–1991)) и Альфреду Херши (Alfred Day Hershey (1908–1997)) была присуждена Нобелевская премия. Крайне интересна формулировка комитета на церемонии вручения: «Честь в первую очередь принадлежит Дельбрюку, который превратил исследования бактериофагов из смутного эмпиризма в точную науку» (https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1969/ceremony-speech/). Т.е. Нобелевский комитет решил в первую очередь отметить лауреата не как автора какого-то определенного открытия или теории, но как человека, изменившего стиль работы, что привело к значительному прогрессу в данной области. Случай достаточно необычный в практике присуждения этой престижной награды. Важным источником информации о деятельности Фаговой группы может служить сборник статей-воспоминаний ключевых участников событий, изданный под редакцией Г. Стента в 1966 г. [108].

Макс Дельбрюк – немецкий физик-теоретик, работавший в начале 30-х гг. с Нильсом Бором в Копенгагене, а также сотрудничавший с русским генетиком Н. Тимофеевым-Ресовским и Г. Мёллером. В 1937 г., получив двухлетнюю стипендию Рокфеллеровского фонда, Дельбрюк отправляется в США, желая заниматься экспериментальной (!) генетикой. Последовавшие вскоре политические события в Германии и начало Второй мировой войны помешали ему вернуться на родину. При поддержке Рокфеллеровского фонда и Х.Т. Моргана ему удалось получить работу в США, и до конца своей научной карьеры Дельбрюк оставался американским ученым, работая в университете Вандербильдта в Нэшвилле, а затем снова в Калтехе [47, 109].

В 1938 г. в Калтехе Дельбрюк встретился с Эмори Эллисом (Emory Ellis; 1906–2003). Эллис получил персональную стипендию для исследований в области канцерогенеза. Считая, что в развитии рака принимают участие вирусы, он решил пролить свет на фундаментальную природу последних. Однако в качестве модельного объекта он выбрал именно бактериофаги, поскольку работать с ними было гораздо проще, чем с вирусами животных или растений. Эллис показал Дельбрюку свои эксперименты по демонстрации жизненного цикла бактериофага (первые версии эксперимента единичного цикла роста), которые настолько впечатлили Дельбрюка, что он переключился на работу с бактериофагами совместно с Эллисом. В 1939 г. они опубликовали статью «The growth of bacteriophage» [110]. Эта работа далеко выходит за рамки простого эксперимента единичного цикла роста и представляет собой, в сущности, тщательную количественную калибровку выбранной экспериментальной системы, позволяющую не только дать строгую интерпретацию результатов, но и заложить основу для дальнейших исследований на ее основе. Эллис и Дельбрюк оценили влияние разных факторов (температура, плотность газона бактерий, концентрация агара, время контакта бактерий и фагов до посева) на результаты титрования фага, что позволило им опровергнуть имевшиеся в то время сообщения о сложной зависимости числа бляшек от разведения (которое косвенно давало поддержку теории трансмиссивного автолиза Бордэ). Авторы учли также такой фактор, как эффективность посева (efficiency of plating), и экспериментально показали, что в их условиях эффективность посева составляет 0,4–0,5 бляшки на одну фаговую частицу (точнее, на 1 минимальную заражающую дозу в жидкой культуре). Наконец, авторы исследовали саму кривую роста фага в разных условиях, изучили разброс урожая фаговых частиц в отдельных клетках, определили константу адсорбции использованного вируса. Таким образом, хотя формально основной результат этой работы практически повторяет наблюдение д'Эрелля о том, что рост бактериофагов происходит не непрерывно, а «толчками», методологически она была прорывом на принципиально новый уровень.

В отличие от Бордэ и сторонников его теории, включая Дж. Нортропа, опубликовавшего свое исследование в том же 1939 г. [111], Дельбрюк справедливо считал главным проявлением деятельности бактериофага не лизис клеток и культур бактерий, но репродукцию частиц вируса. С первых дней знакомства с техникой посева фага в лаборатории Эллиса Макс Дельбрюк пол-

ностью принял концепцию, что бляшка – это макроскопический результат размножения отдельной частицы бактериофага: «Я был совершенно ошеломлен тем, что существует такая простая процедура, чтобы визуализировать частицы вируса... Это было за пределами моих самых диких мечтаний о простых экспериментах на чем-то подобном атому в биологии» (цит. по книге Fischer и Lipson [109]).

Именно этот процесс репликации бактериофага стал центром научных интересов Дельбрюка на ближайшее десятилетие. Вслед за смелыми предположениями Нильса Бора он видел в этом внешне несложном явлении возможное проявление некой комплементарности, основанной, возможно, на квантово-механических явлениях. Однако в руках исследователей была лишь методика титрования, которая позволяла визуализировать фаг до его взаимодействия с клеткой и после выхода из нее. Инфицированная фагом клетка оставалась «черным ящиком».

Дельбрюк начинает свои собственные эксперименты с целью дальнейшей «калибровки» экспериментальной системы, изучив особенности адсорбции фага на клетки и влияние различных факторов на этот процесс [112]. Он показал, что после адсорбции на клетке-хозяине вирус перестает быть чувствителен к нейтрализующим антителам, т.е. проникает в клетку [113], прояснил вопрос об истинной взаимосвязи лизиса и репродукции фага [114].

С 1940 г. М. Дельбрюк начинает сотрудничество с Сальватором Луриа, а с 1943 г. к ним присоединился Альфред Херши. Эти трое ученых и составили первоначальную Фаговую группу, к которой впоследствии присоединились и другие коллеги. Для того чтобы добиться сопоставимости результатов разных лабораторий, Дельбрюк совместно с Дорманом формирует коллекцию «авторизованных» фагов – знаменитую Т-серию (1944 г.), призывая исследователей присоединиться к так называемому «фаговому договору» и выполнять свои эксперименты именно на этих вирусах. Интересно, что Дельбрюк сознательно не включил в Т-серию ни одного умеренного фага.

В 1943 г. (технически номер журнала *Genetics* вышел в начале 1944 г.) Луриа и Дельбрюк публикуют, вероятно, наиболее известную свою работу – флуктуационный тест [115] – показавшую, что мутации устойчивости бактерий к фагам возникают до контакта с вирусом, т.е. работает дарвиновский, а не ламарковский механизм эволюции. Идея флуктуационного теста заключалась в том, что если устойчивость возникает в ответ на воздействие фага, то при посеве на фаговый агар множества культур, являющихся результатом размножения единственной клетки, или небольшого числа клеток, как в реальности было в эксперименте Луриа и Дельбрюка, число вырастающих колоний устойчивых бактерий будет флуктуировать, подчиняясь нормальному распределению. В том случае, если мутации возникают независимо от контакта с фагом, в небольшом числе культур они возникнут на ранней стадии роста, и к моменту посева будут составлять очень большую долю популяции. Таким образом, число пробирок, в которых количество мутантов резко больше среднего, будет выше, чем предсказывается нормальным распределением. Дельбрюк разработал соответствующую математическую модель и статистический тест, позволяющий соотнести данные с предсказаниями по обоим вариантам. На основании анализа сотен повторностей авторы доказали, что выполняются предсказания дарвиновской модели. Интересно, что в 1940-е гг. наличие хромосом и генов у бактерий еще не было широко признано, поэтому значение этой публикации для генетики микроорганизмов существенно выходило за рамки проблемы механизмов эволюции. В 1949 г. этот результат был подтвержден Newcombe [116], поставившим более наглядный эксперимент без использования сложного математического аппарата. После посева бактерий на чашки Newcombe проинкубировал их несколько часов, чтобы образовались микроколонии. После этого он перераспределил бактерии на некоторых чашках, втирая в них небольшое количество стерильного физиологического раствора. После этого чашки с перераспределенной биомассой и чашки с интактными микроколониями были опрысканы из пульверизатора суспензией фага T1. Очевидно, что если бы мутации устойчивости возникали вследствие контакта с фагом, то перераспределение биомассы не оказало бы влияния на число устойчивых колоний. Однако в реальности на «перераспределенных» чашках рост устойчивых бактерий был значительно более интенсивным, что соответствовало предсказаниям дарвиновской модели.

Важнейшим достижением эксперимента Луриа и Дельбрюка было не столько ниспровержение последнего оплота ламаркизма (в адаптации бактерий), сколько доказательство того, что у бактерий имеют место истинные мутации, возникающие до действия силы отбора. Как мы уже видели, сам по себе этот факт был многократно продемонстрирован ранее [35], однако методологическое совершенство работы Luria и Delbruck [115] было настолько убедительным, что в «коллективной мифологии» научного сообщества [12] именно эта публикация воспри-

нималась как рождение генетики бактерий. Тем не менее с точки зрения научной программы Дельбрюка это было отклонением от главной линии работы.

В это же время Луриа и Дельбрюк начинают сотрудничать с Т. Андерсоном, который получил в свое распоряжение один из первых электронных микроскопов. Полученные Luria и Anderson [117] в 1942 г. изображения частиц (вероятно, Т-четного) бактериофага позволили установить, что они имеют вполне определенную морфологию головастика с шестиугольной головкой и хвостовым отростком, при этом размер этих частиц (~ 0,06 × 0,2 мкм) вполне соответствовал сделанным ранее биофизическим оценкам (см. выше). Когда авторы показали свои фотографии Дж. Бронфенбреннеру, тот воскликнул: «Мейн Готт! У них есть хвосты!» (цит. по книге Fischer и Lipson [109]). Таким образом, именно Бронфенбреннера, по-видимому, нужно считать автором термина «хвостатые бактериофаги». Важно отметить, что приоритет электронно-микроскопической визуализации фагов принадлежит, несомненно, Ruska [50], см. также обзор Kruger et al. [51], но из-за войны опубликованные в немецких журналах работы не были доступны в США.

В дальнейшем, используя электронный микроскоп, Луриа, Андерсен и Дельбрюк подтвердили основные этапы жизненного цикла фага, вычисленные им по кривым единичного цикла роста, и также показали, что фаговая частица не проникает внутрь инфицированной клетки, а остается снаружи в течение всего латентного периода.

Стараясь раскрыть суть происходящего в инфицированной клетке, участники Фаговой группы использовали несколько различных подходов. Так, в чрезвычайно изящной работе Luria и Latarjet [118], изучая зависимость инактивации ультрафиолетом инфицированных фагом клеток, взятых в разные моменты после инфекции, от дозы облучения, заметили, что расчетная чувствительность (гипотетического) единичного фага внутри инфицированной клетки сначала падает, а ближе к моменту лизиса вновь возрастает. Авторы интерпретировали этот как первоначальное накопление экранирующего вещества (нуклеиновой кислоты), которое затем «тратится на синтез бактериофага». Отметим, что к этому моменту участникам Фаговой группы уже была известна классическая работа Avery et al. [119], показавших, что ДНК, как минимум, имеет некоторое отношение к механизму наследственности, будучи фактором, отвечающим за трансформацию пневмококков. Таким образом, Луриа и Латаржи описали особый период существования бактериофага в клетке, не сводимый к простому наличию вирусных частиц внутри бактерии. Существование эклипс-периода было подтверждено в 1950 г. работами Doermann [120] и Anderson и Doermann [121], применившими целый набор методов для преждевременного разрушения инфицированных клеток (обработка цианидом, лизис извне высокими дозами фага Т6, ультразвуковое разрушение). Впоследствии в практику вошел лизис с помощью хлороформа [122], который употребляют и до нашего времени.

Чуть ранее Дельбрюк попытался вызвать преждевременный лизис инфицированных клеток, используя ко-инфекцию бактериофагами с разной длительностью латентного периода (подход, аналогичный работе Burnet и McKie [61] по искусственному лизису лизогенных бактерий!). Однако вместо ожидаемого лизиса Дельбрюк обнаружил взаимное исключение (интерференцию) бактериофагов – при заражении одной клетки разными фагами успешно размножался только один из них [123]. Это явление (механизмы которого не всегда ясны и в наше время) очень увлекло Дельбрюка, так как он видел в нем возможное проявление той самой квантовой комплементарности, которая, как он предполагал, лежит в основе репликации вируса (термины «взаимное исключение» и «интерференция» заимствованы им из физики). В 1946 г. исследования Delbrück и Bailey [124] и, независимо от них, Hershey [125] результатов заражения клетки разными вариантами (первоначально использовали полученные Luria [126] мутанты фага по спектру хозяев) обнаружили появление гибридных бактериофагов, т.е. наличие у фагов рекомбинации [127]. Таким образом, удалось не только доказать существование генов у вирусов бактерий, но и привести эти объекты в сферу действия приемов генетического анализа, хорошо разработанных на классических объектах генетики (как мы видели выше, практически одновременно генетический анализ удалось применить и к бактериям). Таким образом, концепция вируса как трансмиссивного гена, а точнее генетической программы, состоящей из нескольких генов, получила строгие экспериментальные доказательства, хотя физическая природа гена была в тот момент еще не известна. Сочетание двух упомянутых подходов (облучения ультрафиолетом и множественных инфекций) привело к открытию реактивации убитого ультрафиолетом бактериофага при множественном инфицирофании клетки [128] – механизм, известный ныне как рекомбинационная репарация. В дальнейшем использование в качестве модельных объектов *rII*-

мутантов Т-четных бактериофагов, открытых Hershey [125, 129] привело к существенному прогрессу в понимании структуры гена благодаря ставшим классическими работам еще одного участника Фаговой группы – Сеймура Бензера [Seymour Benzer (1921–2007)] [130]. Важным преимуществом этой системы было то, что, помимо формирования *rII*-мутантами фага Т4 особых крупных бляшек, эти мутанты были не способны к росту на штамме *E. coli* K-12, лизогенном по фагу λ. В то же время фаг Т4 дикого типа нормально растет на этом хозяине (этот эффект связан с тем, что гены *rIIAB* позволяют преодолеть действие антифаговой системы *rexAB*, кодируемой профагом λ). Поэтому образование даже минимального количества частиц дикого типа в результате скрещивания двух разных *rII* мутантов было легко обнаружить. Помимо скрещиваний фагов Бензером был предложен так называемый *цис-транс* тест, основанный на комплементации белковых продуктов при совместном заражении клетки мутантами по разным генам, но не разными мутантами по одному и тому же гену [130], что позволило очертить методами высокоразрешающего генетического картирования границы отдельных генов или, в терминологии Бензера, цистронов (в частности, *rIIA* и *rIIB*). Достигнутая разрешающая способность генетического картирования *rII*-области даже позволила Crick et al. [131] вычислить основные свойства генетического кода, используя исключительно результаты скрещиваний ряда *rII*-мутантов!

Последним штрихом для формирования современной концепции вируса стал широко известный эксперимент Hershey и Chase [132], которые в 1952 г., используя радиоактивную метку, показали, что при инфекции фагом Т2 практически весь белок фаговой частицы, помеченный радиоактивной серой, остается снаружи клетки, а меченная фосфором ДНК полностью проникает в клетку. Это доказывало, что ДНК не только отвечает за *некоторые* гены (что было показано Avery et al. [119] в 1944 г.), но является носителем *всех* генов сложной генетической программы репродукции бактериофага.

В следующем 1953 г. Дж. Уотсон, работавший ранее под руководством С. Луриа, и Ф. Крик опубликовали их знаменитую модель структуры ДНК, что позволило вышеприведенной концепции быстро стать общепринятой.

Немалую роль в быстром принятии новой концепции вируса сыграли и непосредственные усилия Фаговой группы по распространению (или, выражаясь современным языком, продвижению) своих подходов в научном сообществе. С 1945 г. в лаборатории Колд Спринг Харбор (CSH) был организован практический курс по работе с бактериофагами, который в 1945–1946 гг. вел сам Дельбрюк с помощью двух своих студентов (с 1947 г. курс вел А. Новик). Также существенное влияние оказала летняя конференция (семинар) по бактериофагам и молекулярной генетики в Колд Спринг Харбор, которая продолжается и поныне. Важно отметить, что помимо научных стандартов М. Дельбрюку удалось создать на этих мероприятиях атмосферу неформального и дружественного научного общения, которая характерна для большинства конференций по бактериофагам и в наши дни.

Таким образом, подводя итог, можно отметить, что природа вируса как особой формы жизни, представляющей собой трансмиссивную генетическую программу, была выяснена в результате исследований жизненных циклов бактериофагов. Интересно, что эта работа шла практически параллельно со стороны исследователей лизогении (решающий вклад в которые сделали А. Львов, а также группа Дж. Ледерберга), а также исследований литического цикла на модели фагов Т-серии, осуществленных Фаговой группой, вдохновляемой харизматическим лидером в лице М. Дельбрюка.

ДАЛЬНЕЙШЕЕ РАЗВИТИЕ БИОЛОГИИ БАКТЕРИОФАГОВ

Начиная с 1960-х гг. исследования бактериофагов перестали быть результатом усилий относительно небольшого числа микробиологов, вирусологов и генетиков, но превратились в одно из важнейших направлений биологической науки, с большим количеством лабораторий и действующих лиц.

Интенсивные исследования небольшого набора модельных объектов позволили еще в 1950–1960 гг. выяснить основные закономерности морфогенеза вирусных частиц, что стало возможным не только благодаря прогрессу методов электронной микроскопии, но и в результате создания методов работы с условно-летальными мутантами бактериофагов, дефектными по синтезу различных морфогенетических белков. Заражая такими мутантами клетки бактерий в непермиссивных условиях (или используя непермиссивные штаммы хозяев, лишенные соответствующих супрессорных генов), удавалось получить в достаточном количестве промежуточные продукты морфогенеза [49].

В 1960–1980 гг. были открыты большинство семейств нехвостатых бактериофагов, некоторые из которых стали важными модельными

объектами молекулярной биологии (например, РНК-содержащий фаг MS2 семейства Leviviridae, содержащие одноцепочечную ДНК фаги φX174 (Microviridae) и нитчатый фаг M13 (Inoviridae) [2, 133]). Фаг φX174 стал первым организмом, геном которого был полностью секвенирован в 1977 г. [134].

В дальнейшем исследования взаимодействий фаг-клетка дали большую часть инструментария генной инженерии (эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу, системы сайт-специфической рекомбинации, а позднее CRISPR-Cas редактирование геномов [133]. В 1985 г. были разработаны методы фагового дисплея, за создание которых в 2018 г. Г. Смиту и сэру Г. Винтеру присуждена Нобелевская премия по химии [135].

С конца 1990 гг. биология бактериофагов постепенно переключается с детального изучения немногочисленных классических модельных систем [136] на широкое исследование биоразнообразия вирусов прокариот (к бактериофагам добавились вирусы архей, активно изучаемые с 1990-х гг.). Резкое расширение спектра объектов стало возможным благодаря развитию методов геномики и метагеномики, биоинформатического анализа, а также более производительных подходов структурной вирусологии, таких, как криоэлектронная реконструкция и криоэлектронная томография. В этот же период стала очевидной существенная роль вирусов бактерий и архей в экологии большинства природных экосистем [137].

Глубокое изучение вопросов экологии и совместной эволюции бактерий и фагов, открытие и характеристика родственных бактериофагам клеточных структур бактерий, а также большое число открытых примеров кооперативного взаимодействия бактерий и фагов (в особой степени это касается умеренных вирусов) и другие открытия в сущности изменили представления о вирусах бактерий как о молекулярных паразитах. Современные представления о взаимодействиях бактериофагов и их хозяев изобилуют примерами, когда такое взаимодействие оказывается выгодно не только вирусу, но и хозяину, причем соответствующие эффекты описаны на всех уровнях организации, от отдельных генов и геномов до экосистем и биосферы в целом. Таким образом, можно утверждать, что отношения типа паразитизма являются лишь частным проявлением феномена бактериофагии, являющегося одной из фундаментальных основ существования микробной жизни на нашей планете [2, 133, 136, 137].

Однако автор считает преждевременным детальное рассмотрение истории этих исследований ввиду того, что эта история творится непосредственно на наших глазах, и автор считает невозможным выделить наиболее существенные работы и открытия (автоматически исключив из числа существенных все другие). Возможно, это будет более уместно сделать спустя еще несколько десятилетий, когда большинство ученых, работавших в этой области в данный период времени, сойдут со сцены.

Финансирование. Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-14-50503).

Благодарности. Автор благодарен Е.Е. Куликову за ценные замечания и помощь в оформлении рукописи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stent, G. S. (1960) *Papers on Bacterial Viruses*, Boston, Mass., pp. 365, doi: 10.1126/science.134.3471.44-c.
2. Летаров А. В. (2019) *Современные концепции биологии бактериофагов*, ДеЛи, М.
3. Шлегель Г. Г. (2020) *История микробиологии*, URSS, M.
4. Debré, P. (1998) *Louis Pasteur*, John Hopkins University Press, Baltimore.
5. Lakhtakia, R. (2014) The legacy of Robert Koch: surmise, search, substantiate, *Sultan Qaboos Univ. Med. J.*, **14**, e37-e41, doi: 10.12816/0003334.
6. Blevins, S. M., and Bronze, M. S. (2010) Robert Koch and the “golden age” of bacteriology, *Int. J. Infect. Dis.*, **14**, e744-e751, doi: 10.1016/j.ijid.2009.12.003.
7. Winau, F., and Winau, R. J. M. (2002) Emil von Behring and serum therapy, *Microbes Infect.*, **4**, 185-188, doi: 10.1016/s1286-4579(01)01526-x.
8. Киценко О. С., Киценко Р. Н., Белова Л. И. (2015) Проблемы медицинского обеспечения Красной Армии в годы Великой Отечественной войны (по свидетельствам медиков Сталинграда), *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*, **53**, 86-88.
9. Silva, M. (2018) From Bombay to Rio de Janeiro: the circulation of knowledge and the establishment of the Manguinhos laboratory, 1894-1902, *Hist. Cienc. Saude Manguinhos*, **25**, 639-657, doi: 10.1590/S0104-59702018000400003.
10. URL: URL: http://www.samoupravlenie.ru/37-10.php.
11. Van Kammen, A. (1999) Beijerinck’s contribution to the virus concept – an introduction, *Arch. Virol. Suppl.*, **15**, 1-8, doi: 10.1007/978-3-7091-6425-9_1.
12. Summers, W. C. (1991) From culture as organism to organism as cell: historical origins of bacterial genetics, *J. Hist. Biol.*, **24**, 171-190, doi: 10.1007/BF00209428.

13. Ivanovski, D. (1892) Über die mosaikkrankheit der tabakspflanze, *Bulletin scientifique publié par l'Académie impériale des sciences de Saint-Pétersbourg*, **35**, 67-70.
14. Loeffler, F., and Frosch, P. (1898) Report of the commission for research on foot-and-mouth disease, *Zent. Bakt. Parasitkde. Abt. I*, **23**, 371-391.
15. Ивановский Д. И. (1892) Мозаичная болезнь табака, *Труды Варшавского университета*, **6**, 49-72.
16. Жирнов О. П., Георгиев Г. П. (2017) Д.И. Ивановский – первооткрыватель вирусов как новой формы биологической жизни, *Вестник Российской академии медицинских наук*, **72**, 84-86.
17. Los, M., Czyz, A., Sell, E., Wegrzyn, A., Neubauer, P., and Wegrzyn, G. (2004) Bacteriophage contamination: is there a simple method to reduce its deleterious effects in laboratory cultures and biotechnological factories? *J. Appl. Genet.*, **45**, 111-120.
18. Abedon, S. T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A., and Mazure, H. (2011) Bacteriophage prehistory: is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage*, **1**, 174-178, doi: 10.4161/bact.1.3.16591.
19. Hankin, E. H. (1896) The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes, *Ann. Inst. Pasteur*, **10**, 511-523.
20. Гамалея Н. Ф. (1898) Бактериолизины – ферменты, разрушающие бактерии, *Русский архив патологии*, 607-613.
21. Bardell, D. (1982) An 1898 report by Gamaleya for a lytic agent specific for Bacillus anthracis, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, **37**, 222-225, doi: 10.1093/jhmas/xxxvii.2.222.
22. Thomas, G. H. (2014) *Frederick William Twort: not just bacteriophage*, in Microbiology Society.
23. Twort, F. W. (1915) An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses, *Lancet*, **186**, 1241-1243.
24. Кунин Е. В. (2017) *Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции*, ЗАО «Центрполиграф», Москва.
25. Twort, F. W. (1936) Further investigations on the nature of ultra-microscopic viruses and their cultivation, *J. Hyg. (Lond)*, **36**, 204-235, doi: 10.1017/s0022172400043606.
26. Dublanchet, A. (2017) *Autobiographie de Félix d'Hérelle. Les pérégrinations d'un bactériologiste*, Lavoisier, Paris.
27. Summers, W. C. (2016) Felix Hubert d'Herelle (1873-1949): history of a scientific mind, *Bacteriophage*, **6**, e1270090, doi: 10.1080/21597081.2016.1270090.
28. D'Hérelle, F. (2007) On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917, *Res. Microbiol.*, **158**, 553, doi: 10.1016/j.resmic.2007.07.005.
29. D'Hérelle, F. (1921) *Le bactériophage; son rôle dans l'immunité*, Masson et cie, Paris.
30. Д'Эрелль, Ф. (1926) *Бактериофаг и его значение для иммунитета*, (пер. под ред. [и с предисл.] проф. С. В. Коршуна), Гос. Изд-во, Москва, Ленинград.
31. D'Hérelle, F. (1931) An address on bacteriophagy and recovery from infectious diseases, *Can. Med. Assoc. J.*, **24**, 619-628.
32. Schmalstieg, F. C., Jr., and Goldman, A. S. (2009) Jules Bordet (1870-1961): a bridge between early and modern immunology, *J. Med. Biogr.*, **17**, 217-224, doi: 10.1258/jmb.2009.009061.
33. D'Hérelle, F., and Smith, G. H. (1926) *The bacteriophage and its behavior*, The Williams & Wilkins Company, p. 629.
34. Billiau, A. (2016) At the centennial of the bacteriophage: reviving the overlooked contribution of a forgotten pioneer, Richard Bruynoghe (1881-1957), *J. Hist. Biol.*, **49**, 559-580, doi: 10.1007/s10739-015-9429-0.
35. Gratia, A. (1921) Studies on the d'Herelle phenomenon, *J. Exp. Med.*, **34**, 115-126, doi: 10.1084/jem.34.1.115.
36. Bordet, J., and Ciuca, M. (1921) Remarques sur l'historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **84**, 745-747.
37. McKinley, E. B. (1925) Sérum antilytique obtenu par immunisation contre une bactйrie normale, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **93**, 1050-1052.
38. Northrop, J. H., and Krueger, A. P. (1932) The role of intracellular bacteriophage in lysis of susceptible staphylococci, *J. Gen. Physiol.*, **15**, 329-332, doi: 10.1085/jgp.15.3.329.
39. Northrop, J. H. (1937) Chemical nature and mode of formation of pepsin, trypsin and bacteriophage, *Science*, **86**, 479-483, doi: 10.1126/science.86.2239.479.
40. Bordet, J. B. V. (1931) Croonian Lecture. – The theories of the bacteriophage, *Proc. R. Soc. Ser. B*, **107**, 398-417, doi: 10.1098/rspb.1931.0005.
41. Appelmans, R. (1921) Le dosage du bactériophage, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **85**, 701.
42. Gratia, J.-P. (2000) Andre Gratia: a forerunner in microbial and viral genetics, *Genetics*, **156**, 471-476.
43. Gratia, A. (1922) The Twort-d'Herelle phenomenon: II. Lysis and microbic variation, *J. Exp. Med.*, **35**, 287-302, doi: 10.1084/jem.35.3.287.
44. Summers, W. C. (1991) On the origins of the science in Arrowsmith: Paul de Kruif, Felix d'Herelle, and phage, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, **46**, 315-332, doi: 10.1093/jhmas/46.3.315.
45. Gratia, A. (1936) Des relations numeriques entre bacteries lysogènes et particules de bactériophage, *Ann. Inst. Pasteur*, **57**, 652-676.
46. Muller, H. J. (1922) Variation due to change in the individual gene, *Am. Naturalist*, **56**, 32-50.
47. Summers, W. C. (1993) How bacteriophage came to be used by the Phage Group, *J. Hist. Biol.*, **26**, 255-267, doi: 10.1007/Bf01061969.
48. Schlesinger, M. (1934) Zur frage der chemischen zusammensetzung des bakteriophagen, *Biochem. Z.*, **273**, 306.
49. Grafe, A. (1991) *A history of experimental virology*, Springer-Verlag, Berlin; New York.
50. Ruska, H. (1940) Die Sichtbarmachung der bakteriophagen lyse im Übermikroskop, *Naturwissenschaften*, **28**, 45-46.
51. Kruger, D. H., Schneck, P., and Gelderblom, H. R. (2000) Helmut Ruska and the visualisation of viruses, *Lancet*, **355**, 1713-1717, doi: 10.1016/s0140-6736(00)02250-9.
52. Kirchhelle, C. (2019) The forgotten typers: the rise and fall of Weimar bacteriophage-typing (1921–1935), *Notes Records*, doi: 10.1098/rsnr.2019.0020.
53. Lwoff, A. (1953) Lysogeny, *Bacteriol. Rev.*, **17**, 269-337.
54. Otto, R., and Munter, H. (1921) Zum d'Herelleschen Phänomen, *Dtsch. Med. Wchnschrft*, **47**, 1579.
55. Otto, R., and Munter, H. (1923) Weitere untersuchungen zum d'Herelleschen Phänomen, **100**, 402-415.
56. Bail, O. (1922) Elementarbakteriophagen des Shigabacillus, *Wien. Klin. Wochenschr.*, **35**, 722-724.
57. Gildmeister, E., and Herzberg, K. (1924) Zur theorie der bakteriophagen (d'Herelle Lysine). 6. Mitteilung über das d'Herellesche phanomen, *Zentr Bakteriol Parasitenk I Abt. Orig.*, **93**, 402-420.
58. Bail, O. (1925) Der Kolistamm 88 von Gildemeister und Herzberg, *Med. Klein.*, **21**, 1271-1273.

59. Bordet, J. (1925) Le problème de l'autolyse microbienne transmissible ou du bactériophage, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1-47.
60. Bordet, J., and Renaux, E. (1928) L'autolyse bacterienne transmissible ou le bacteriophage, *Ann. Inst. Pasteur*, **42**, 1283.
61. Burnet, F. M., and McKie, M. (1929) Observations on a permanently Lysogenic Strain of *B. enteritidis* gaertner, *Australian J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **6**, 277-284.
62. Sankaran, N. (2010) The bacteriophage, its role in immunology: how Macfarlane Burnet's phage research shaped his scientific style, *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.*, **41**, 367-375, doi: 10.1016/j.shpsc.2010.10.012.
63. Burnet, F. M. (1934) The bacteriophages, *Biol. Rev.*, **9**, 332-350.
64. Dooren de Jong, E. D. (1931) Studien über Bakteriophagie. I. Über Bac. megatherium und den darin anwesenden Bakteriophagen, *Zentralbl. Bakter. Parasitenkund. Abt. I. Orig.*, **120**.
65. Wollman, E. (1928) Bactériophagie et processus similaires. Hérédité ou infection, *Bull. Inst. Pasteur*, **26**, 1-14.
66. Wollman, E. (1934) Bactériophagie (autolyse hérédocontagieuse) et bactériophages (facteurs lysogènes), *Bull. Inst. Pasteur*, **32**, 945-955.
67. Wollman, E., and Wollman, E. (1936) Régénération des bactériophages chez le B. megatherium lysogène, *CR Soc. Biol.*, **122**, 190-192.
68. Wollman, E., and Wollman, E. (1937) Les phases de bacteriophages (facteurs lysogènes), *CR Soc. Biol.*, **124**, 931-934.
69. Lwoff, A., and Gutmann, A. (1950) Recherches sur un *Bacillus megatherium* lysogene, *Ann. Ins.t Pasteur (Paris)*, **78**, 711-739.
70. Lwoff, A., Siminovitch, L., and Kjeldgaard, N. (1950) Induction of the production of bacteriophages in lysogenic bacteria, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **79**, 815-859.
71. Херш, А. Д. (1975) *Фаг лямбда*, Мир, Москва, с. 7-20.
72. Херши А. Д. (1975) *Фаг лямбда*, Мир, Москва, с. 21-64.
73. Gottesman, M. E., and Weisberg, R. A. (2004) Little lambda, who made thee? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 796-813, doi: 10.1128/MMBR.68.4.796-813.2004.
74. Hayes, W. (1980) Portraits of viruses: bacteriophage lambda, *Intervirology*, **13**, 133-153, doi: 10.1159/000149119.
75. Casjens, S. R., and Hendrix, R. W. (2015) Bacteriophage lambda: early pioneer and still relevant, *Virology*, **479-480**, 310-330, doi: 10.1016/j.virol.2015.02.010.
76. Lederberg, J., and Tatum, E. L. (1946) Gene recombination in *Escherichia coli*, *Nature*, **158**, 558, doi: 10.1038/158558a0.
77. Lederberg, E. M. (1951) Lysogenicity in *E. coli* K-12, *Genetics*, **36**, 560-560.
78. Campbell, A. (2007) Phage integration and chromosome structure. A personal history, *Annu. Rev. Genet.*, **41**, 1-11, doi: 10.1146/annurev.genet.41.110306.130240.
79. Lederberg, E. M., and Lederberg, J. (1953) Genetic studies of lysogenicity in *Escherichia coli*, *Genetics*, **38**, 51-64.
80. Wollman, E., and Jacob, F. (1957) Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *Escherichia coli*. 2. La localisation chromosomique du prophage-gamma et les consequences genetiques de l'induction zygotique, *Ann. Inst. Pasteur*, **93**, 323-339.
81. Ptashne, M. (1967) Isolation of the lambda phage repressor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 306-313, doi: 10.1073/pnas.57.2.306.
82. Пташне, М. (1988) *Переключение генов. Регуляция генной активности и фаг лямбда*, Мир, М.
83. Zinder, N. D. (1992) Forty years ago: the discovery of bacterial transduction, *Genetics*, **132**, 291-294.
84. Morse, M. L., Lederberg, E. M., and Lederberg, J. (1956) Transduction in *Escherichia coli* K-12, *Genetics*, **41**, 142-156.
85. Fruciano, D. E., and Bourne, S. (2007) Phage as an antimicrobial agent: d'Herelle's heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West, *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, **18**, 19-26, doi: 10.1155/2007/976850.
86. Summers, W. C. (2012) The strange history of phage therapy, *Bacteriophage*, **2**, 130-133, doi: 10.4161/bact.20757.
87. Summers, W. C. (2001) Bacteriophage therapy, *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 437-451, doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.437.
88. Almeida, G. M. F., and Sundberg, L. R. (2020) The forgotten tale of Brazilian phage therapy, *Lancet Infect. Dis.*, **20**, e90-e101, doi: 10.1016/S1473-3099(20)30060-8.
89. Myelnikov, D. (2018) An alternative cure: the adoption and survival of bacteriophage therapy in the USSR, 1922-1955, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, **73**, 385-411, doi: 10.1093/jhmas/jry024.
90. Gelman, D., Eisenkraft, A., Chanishvili, N., Nachman, D., Coppenhagem Glazer, S., and Hazan, R. (2018) The history and promising future of phage therapy in the military service, *J. Trauma Acute Care Surg.*, **85**, S18-S26, doi: 10.1097/TA.0000000000001809.
91. Chanishvili, N. (2012) Phage therapy – history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches, *Adv. Virus Res.*, **83**, 3-40, doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
92. Zaffiri, L., Gardner, J., and Toledo-Pereyra, L. H. (2012) History of antibiotics. From Salvarsan to cephalosporins, *J. Invest. Surg.*, **25**, 67-77, doi: 10.3109/08941939.2012.664099.
93. Summers, W. C. (1993) Cholera and plague in India: the bacteriophage inquiry of 1927-1936, *J. Hist. Med. Allied Sci.*, **48**, 275-301, doi: 10.1093/jhmas/48.3.275.
94. D'Hérelle, F., and Malone, R. H. (1927) A preliminary report of work carried out by the cholera bacteriophage enquiry, *Ind. Med. Gaz.*, **62**, 614-616.
95. D'Hérelle, F. (1929) Studies upon asiatic cholera, *Yale J. Biol. Med.*, **1**, 195-219.
96. D'Hérelle, F. (1931) Bacteriophage as a treatment in acute medical and surgical infections, *Bull. N Y Acad. Med.*, **7**, 329-348.
97. Kuhl, S. J., and Mazure, H. (2011) d'Hйrelle. Preparation of therapeutic bacteriophages, Appendix 1 from: *Le Phénomène de la Guérison dans les maladies infectieuses*: Masson et Cie, 1938, Paris–OCLC 5784382, *Bacteriophage*, doi: 10.4161/bact.1.2.15680.
98. Eaton, M. D., and Bayne-Jones, S. (1934) Bacteriophage therapy: review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections, *J. Am. Med. Assoc.*, **103**, 1769-1776.
99. Krueger, A. P., and Scribner, E. J. (1941) The bacteriophage: its nature and its therapeutic use, *J. Am. Med. Assoc.*, **116**, 2269-2277.
100. Morton, H. E., and Engley, F. B., Jr (1945) Dysentery bacteriophage. Review of the literature on its prophylactic and therapeutic uses in man and in experimental infections in animals, *J. Am. Med. Assoc.*, **127**, 584-591.
101. Казарновская С. С. (1932) *Бактериофагия*, Издательство Академии Наук, Ленинград.

102. Цулукидзе А. (1941) *Опыт применения бактериофага в условиях военного травматизма*, Грузмедгиз, Тбилиси.
103. Покровская М. П., Каганова Л. С., Морозенко М. А., Булгакова А. Г., Скаценко Е. Е. (1941) *Лечение ран бактериофагом*, Медгиз, М.-Л.
104. Павлова Л. И., Сумароков А. А., Солодовников Ю. П., Никитюк Н. М. (1973) К вопросу о применении дизентерийного бактериофага в качестве средства профилактики дизентерии (обзор литературы), *Журн. микр. эпид. иммун.*, **50**, 27-32.
105. Солодовников Ю. П., Павлова Л. И., Гарнова Н. А., Ногтева Ю. Б., Сотемский Ю. С. (1971) Профилактическое применение сухого поливалентного дизентерийного бактериофага с пектином в детских дошкольных учреждениях. Сообщение 2. К обоснованию тактики и схемы применения бактериофага в современных условиях, *Журн. микр. эпид. иммун.*, **48**, 123-127.
106. Солодовников Ю. П., Павлова Л. И., Емельянов П. И., Гарнова Н. А., Ногтева Ю. Б., Сотемский Ю. С., Богдашич О. М., Аршинова В. В. (1970) Профилактическое применение сухого поливалентного дизентерийного бактериофага с пектином в дошкольных учреждениях. Сообщение 1. Результаты строго контролируемого эпидемиологического опыта (Ярославль, 1968), *Журн. микр. эпид. иммун.*, **47**, 131-137.
107. Jones, E. H., Letarov, A. V., and Clokie, M. (2020) Neat science in a messy world: the global impact of human behavior on phage therapy, past and present, *PHAGE*, **1**, 16-22.
108. *Phage and the origins of molecular biology* (1966) (Cairns, J., Stent, G. S., and Watson, J. D., eds), Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York.
109. Fischer, E. P., and Lipson, C. (1988) *Thinking About Science: Max Delbrück and the Origins of Molecular Biology*, Norton, New York.
110. Ellis, E. L., and Delbruck, M. (1939) The growth of bacteriophage, *J. Gen. Physiol.*, **22**, 365-384, doi: 10.1085/jgp.22.3.365.
111. Northrop, J. H. (1939) Increase in bacteriophage and gelatinase concentration in cultures of *Bacillus megatherium*, *J. Gen. Physiol.*, **23**, 59-79, doi: 10.1085/jgp.23.1.59.
112. Delbrück, M. (1940) Adsorption of bacteriophage under various physiological conditions of the host, *J. Gen. Physiol.*, **23**, 631-642, doi: 10.1085/jgp.23.5.631.
113. Delbrück, M. (1945) Effects of specific antisera on the growth of bacterial viruses (bacteriophages), *J. Bacteriol.*, **50**, 137-150.
114. Delbrück, M. (1940) The growth of bacteriophage and lysis of the host, *J. Gen. Physiol.*, **23**, 643-660, doi: 10.1085/jgp.23.5.643.
115. Luria, S. E., and Delbruck, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance, *Genetics*, **28**, 491-511.
116. Newcombe, H. B. (1949) Origin of bacterial variants, *Nature*, **164**, 150, doi: 10.1038/164150a0.
117. Luria, S. E., and Anderson, T. F. (1942) The identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **28**, 127-130, doi: 10.1073/pnas.28.4.127.
118. Luria, S. E., and Latarjet, R. (1947) Ultraviolet irradiation of bacteriophage during intracellular growth, *J. Bacteriol.*, **53**, 149-163.
119. Avery, O. T., Macleod, C. M., and McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III, *J. Exp. Med.*, **79**, 137-158, doi: 10.1084/jem.79.2.137.
120. Doermann, A. H. (1952) The intracellular growth of bacteriophages. I. Liberation of intracellular bacteriophage T4 by premature lysis with another phage or with cyanide, *J. Gen. Physiol.*, **35**, 645-656, doi: 10.1085/jgp.35.4.645.
121. Anderson, T. F., and Doermann, A. H. (1952) The intracellular growth of bacteriophages. II. The growth of T3 studied by sonic disintegration and by T6-cyanide lysis of infected cells, *J. Gen. Physiol.*, **35**, 657-667, doi: 10.1085/jgp.35.4.657.
122. Séchaud, J., and Kellenberger, E. (1956) Lyse précoce, provoquée par le chloroforme, chez les bactéries infectées par du bactériophage, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **90**, 102-106.
123. Delbrück, M. (1945) Interference between bacterial viruses; the mutual exclusion effect and the depressor effect, *J. Bacteriol.*, **50**, 151-170.
124. Delbrück, M., and Bailey, W. T. (1946) Induced mutations in bacterial viruses, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **11**, 33-37.
125. Hershey, A. D. (1946) Mutation of bacteriophage with respect to type of plaque, *Genetics*, **31**, 620-640.
126. Luria, S. E. (1945) Mutations of bacterial viruses affecting their host range, *Genetics*, **30**, 84-99.
127. Luria, S. E. (1948) Sex in bacteria and viruses, *Sci. Mon.*, **66**, 159-162.
128. Luria, S. E. (1947) Reactivation of ultraviolet-inactivated bacteriophage particles inside double-infected host cells, *J. Bacteriol.*, **54**, 79.
129. Hershey, A. D., and Rotman, R. (1949) Genetic recombination between host-range and plaque-type mutants of bacteriophage in single bacterial cells, *Genetics*, **34**, 44-71.
130. Benzer, S. (1955) Fine structure of a genetic region in bacteriophage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **41**, 344-354, doi: 10.1073/pnas.41.6.344.
131. Crick, F. H., Barnett, L., Brenner, S., and Watts-Tobin, R. J. (1961) General nature of the genetic code for proteins, *Nature*, **192**, 1227-1232, doi: 10.1038/1921227a0.
132. Hershey, A. D., and Chase, M. (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage, *J. Gen. Physiol.*, **36**, 39-56, doi: 10.1085/jgp.36.1.39.
133. Salmond, G. P., and Fineran, P. C. (2015) A century of the phage: past, present and future, *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 777-786, doi: 10.1038/nrmicro3564.
134. Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., and Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X 174 DNA, *Nature*, **265**, 687-695, doi: 10.1038/265687a0.
135. Barderas, R., and Benito-Pena, E. (2019) The 2018 Nobel Prize in chemistry: phage display of peptides and antibodies, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 2475-2479, doi: 10.1007/s00216-019-01714-4.
136. Calendar, R. (2006) *The bacteriophages*, 2 edn., Oxford University Press, p. 746.
137. Weinbauer, M. G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses, *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 127-181, doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.

HISTORY OF EARLY BACTERIOPHAGE RESEARCH AND EMERGENCE OF THE KEY CONCEPTS IN VIROLOGY

Review

A. V. Letarov[1,2]

[1] *Winogradsky Institute of Microbiology, RC Biotechnology, Russian Academy of Sciences, 117312 Moscow, Russia; E-mail: letarov@gmail.com*

[2] *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia*

Received July 6, 2020
Revised August 2, 2020
Accepted August 2, 2020

Bacterial viruses – bacteriophages – were discovered 20 years after the discovery of plant and animal viruses; however, the first 40 years of bacteriophage studies had resulted in the establishment of modern concepts of virology and, to a great degree, formed the basis for emergence of molecular genetics and molecular biology. Certain aspects of early history of bacteriophage research have been described in detail in many special publications. In this review, we present a general timeline of the key events that have led to the establishment of main principles of virology. In particular, confrontation of the ideas of F. d'Herelle and J. Bordet on the bacteriophage nature is discussed together with the history of lysogeny phenomenon discovery and elucidation of its nature, works of the Delbrück's Phage Group in the USA, development of methodology for bacteriophage genetic analysis, and other studies that have paved the way to the recognition of the virus (bacteriophage) as a transmissive genetic program. The history of the early attempts of practical applications of bacteriophages, such as phage therapy and phage typing, is also presented.

Keywords: bacteriophages, history of studies, bacteriophage discovery, the Phage Group, discovery of lysogeny, history of phage therapy